

MSC

2.º
CICLO

FCUP
2017

U. PORTO

Implementação de Métodos de Controlo de
Qualidade em Tintas

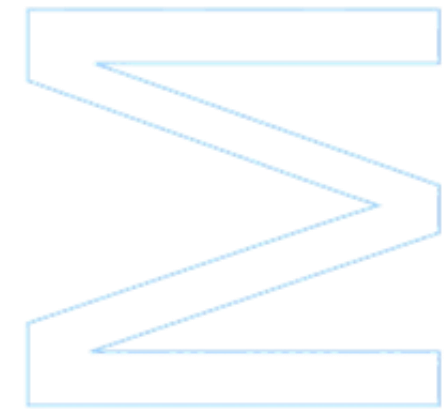
Carlos Duarte Marques Ferreira Vaz

FC



Implementação de Métodos de Controlo de Qualidade em Tintas

Carlos Duarte Marques Ferreira Vaz
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Química Analítica
2017



Implementação de Métodos de Controlo de Qualidade em Tintas

Carlos Duarte Marques Ferreira Vaz

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

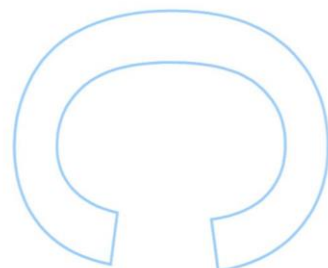
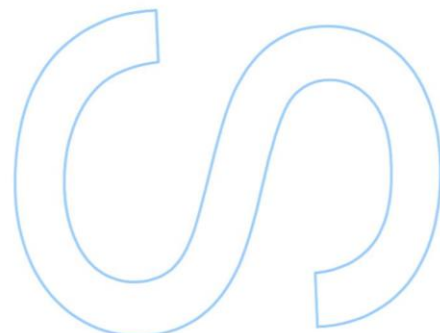
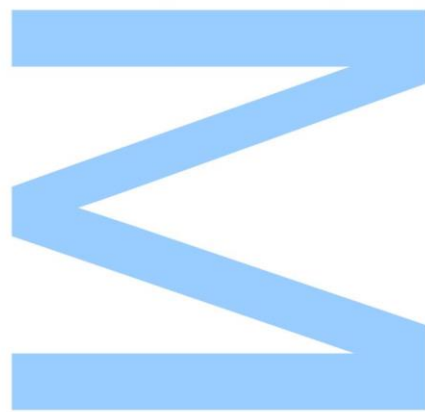
2017

Orientador

Cosme Neves Resende de Moura, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Etelvina Veludo, Gerente de controlo de qualidade, CIN - Corporação Industrial do Norte, S.A.

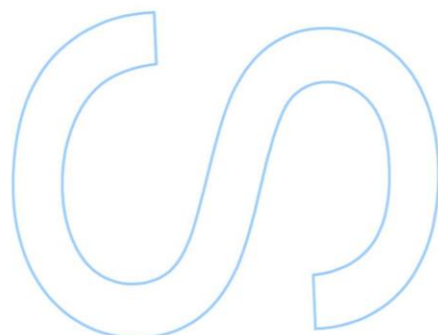
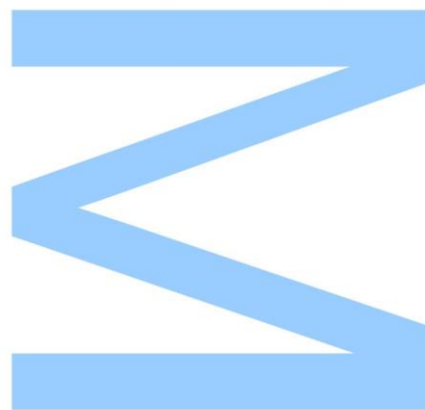




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Nota prévia

O presente relatório foi escrito ao abrigo do acordo de confidencialidade, pelo que neste relatório não serão mencionados nomes nem formulações dos produtos ensaiados, nem qualquer outro tipo de informação relevante que de algum modo possa ser usada por outros para benefício próprio.

Por esta razão, as matérias primas e os produtos acabados ensaiados ao longo da realização deste trabalho são referidos neste relatório de forma codificada.

Agradecimentos

Ao Eng. João Machado, pela oportunidade de desenvolver a minha tese de mestrado na CIN, especificamente no centro de I&D. Também por todo o acompanhamento e recursos que disponibilizou ao longo de todo o projeto. Por ultimo por todas as criticas construtivas que me dirigiu, pelo que me fizeram crescer a nível profissional.

Á Dr.^a Etelvina Veludo, por toda a dedicação, acompanhamento, apoio e confiança que sempre demonstrou e depositou em mim e neste projeto. Por ter exigido e esperado o melhor de mim em todas as situações, nunca deixando de manter uma visão ampla nas dificuldades que foram surgindo.

Ao Dr. Cosme Moura por todo o acompanhamento e apoio prestado, sem duvida teve uma participação bastante importante no desenvolvimento deste projeto.

Á Eng.^a Elisabete Silva por toda a incansável dedicação e acompanhamento que demonstrou ao longo de todo o estágio. Por toda a exigência que me impôs, nunca deixando de dar o apoio necessário e guiando todo o trabalho sob supervisão da Dr.^a Etelvina.

De realçar que estas três pessoas foram fundamentais para todo o projeto. A meu ver fizeram um trabalho fantástico e extremamente profissional.

A todos os meus colegas de trabalho, pelo bom ambiente, apoio e companheirismo.

Aos meus pais, irmão e restante família que nunca deixaram de me apoiar em todos os momentos sem exceção.

Por fim a todos aqueles a quem me orgulho de chamar de amigos e amigas, por todo o suporte.

Resumo

Com a diminuição da quantidade de agentes protetores em muitas tintas de base aquosa e seus constituintes, tem vindo a tornar-se preponderante assegurar a sua preservação, de modo a que estas se mantenham estáveis durante todo o seu período de armazenamento e garantam uma adequada proteção ao substrato após a aplicação da tinta. A proteção de tintas é feita através da adição de um ou mais biocidas em pequenas quantidades. Estes têm como função destruir, repelir, ou neutralizar organismos prejudiciais ao desempenho da tinta.

O uso generalizado de biocidas nos mais diversos setores industriais associado ao seu elevado potencial de contaminação dos recursos hídricos durante a sua produção, utilização ou descarga, fez com que os biocidas fossem incluídos na lista de contaminantes emergentes de grande relevância para o ambiente e para a saúde pública. Recentemente foi emitido um regulamento pela união europeia relativo à utilização de biocidas no mercado, que visa melhorar o funcionamento do mercado assegurando simultaneamente a proteção da saúde humana animal e a segurança ecológica. Este regulamento menciona a importância da redução das quantidades de biocidas utilizados, não deixando que estes percam a sua função. Por esta razão, há todo o interesse em desenvolver métodos que permitam controlar e monitorizar adequadamente os biocidas nas mais variadas matrizes.

O presente trabalho teve por objetivo implementar e validar métodos de análise química de determinação de biocidas em tintas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção UV/Vis. Desenvolveram-se seis métodos de separação e deteção para sete biocidas, cada um com o seu método de extração. Todos os métodos de extração, separação, deteção e quantificação foram validados através de ensaios de recuperação e através de amostras de referência de concentração conhecida de biocida. Também foram avaliados parâmetros como a linearidade, precisão, sensibilidade, seletividade e limites analíticos dos métodos.

Palavras chaves: Tintas de base aquosa; setor industrial; substrato; biocidas; HPLC; UV/Vis; métodos de análise química

Abstract

By reducing the amount of protective agents in many aqueous based paints and their constituents, it has become vital to ensure their preservation so that they remain stable throughout their storage period and ensure adequate protection to the substrate after application of the paint. The protection of paints is done by adding one or more biocides in small quantities. They are intended to destroy, repel, or neutralize organisms that are harmful to the performance of the paint.

The widespread use of biocides in the most diverse industrial sectors associated with their high potential for contamination of water resources during their production, use or discharge has led to biocides being included in the list of emerging contaminants of great relevance to the environment and public health. A regulation has recently been issued by the European Union concerning the use of biocidal products on the market, which aims to improve the functioning of the market whilst ensuring the protection of human animal health and ecological safety. This regulation mentions the importance of reducing the quantities of biocides used and does not allow them to lose their function. For this reason, there is every interest in developing methods that allow proper control and monitoring of biocides in the most varied matrices.

The present work aimed to implement and validate methods of chemical analysis of determination of biocides in paints by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis detection. Six methods of separation and detection were developed for seven biocides, each with its extraction method. All methods of extraction, separation, detection and quantification were validated through recovery assays and through reference samples of known concentration of biocide. Parameters such as linearity, precision, sensitivity, selectivity and analytical limits of the methods were also evaluated.

Keywords: Water based inks; industrial sector; substrate; biocides; HPLC; UV/Vis; methods of chemical analysis

“Hard work does not guarantee success, but no work guarantees failure”

Cesc Fabregas

Índice

Nota prévia.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de tabelas.....	viii
Índice de figuras.....	x
Índice de abreviaturas.....	xii
1 - Introdução.....	1
1.1. - Apresentação e objetivo do estágio curricular.....	1
1.2. - CIN - Corporação Industrial do Norte.....	2
1.3. - Inserção do tema de trabalho.....	2
2 - Tintas.....	5
2.1. - Resinas.....	8
2.2. - Pigmentos.....	10
2.3. - Cargas.....	11
2.4. - Solventes.....	12
2.5. - Aditivos.....	13
3 - Biocidas.....	17
3.1. - Biocidas atualmente utilizados em tintas.....	19
3.1.1. - Izotiazolonas.....	19
3.1.2. - Carbamatos.....	21
3.1.3. - Piretroides.....	22
3.1.4. - Formaldeído.....	24
4 - Cromatografia líquida de alta eficiência.....	25
4.1. - Bomba.....	27
4.2. - Injetor.....	29
4.3. - Coluna.....	30
4.4. - Detetor.....	34
4.4.1. - Detetor UV-VIS.....	35
5 - Validação de métodos analíticos.....	39
5.1. - Precisão.....	39
5.2. - Repetibilidade.....	40

5.3. -	Precisão intermédia.....	41
5.4. -	Exatidão.....	42
5.5. -	Seletividade.....	43
5.6. -	Sensibilidade.....	44
5.7. -	Limites analíticos.....	44
5.8. -	Linearidade.....	46
6 -	Execução experimental.....	49
6.1. -	Reagentes, amostras, material e equipamento.....	49
6.2. -	Procedimento experimental.....	50
6.3. -	Métodos de separação e análise por HPLC-UV/Vis.....	51
7 -	Resultados.....	53
7.1. -	Validação do método 1.....	54
7.1.1. -	Linearidade.....	54
7.1.2. -	Sensibilidade.....	59
7.1.3. -	Seletividade da separação cromatográfica.....	61
7.1.4. -	Limites analíticos.....	64
7.1.5. -	Exatidão.....	66
7.1.6. -	Repetibilidade.....	68
7.1.7. -	Precisão intermédia.....	70
7.2. -	Validação dos restantes métodos.....	72
7.2.1. -	Sensibilidade.....	73
7.2.2. -	Seletividade.....	75
7.2.3. -	Limites analíticos.....	78
7.2.4. -	Exatidão.....	79
7.2.5. -	Precisão intermédia.....	83
8 -	Conclusão.....	87
9 -	Referências bibliográficas.....	89

Índice de tabelas

Tabela 1 - Definições segundo a norma ISO 4618:2014 - Tintas e Vernizes (Termos e definições).....	6
Tabela 2 - Resinas sintéticas mais utilizadas em formulações de tintas.....	9
Tabela 3 - Pigmentos inorgânicos usados na formulação de tintas.....	10
Tabela 4 - Cargas mais usadas na formulação de tintas.....	11
Tabela 5 - Exemplos de microrganismos responsáveis pela degradação de tintas de base aquosa.....	12
Tabela 6 - Classificação de aditivos de acordo com a sua função na tinta	14
Tabela 7 - : Propriedades e função de alguns biocidas da classe das isotiazolonas.....	20
Tabela 8 - Nomenclatura relativa aos três piretroides mais relevantes.....	23
Tabela 9 - Concentrações letais para uma série de espécies perante bifentrina	23
Tabela 10 - Teores de cipermetrina, bifentrina e deltametrina em produtos alimentares.....	23
Tabela 11 - Principais constituintes de um cromatógrafo líquido.....	25
Tabela 12 - Modos de eluição em cromatografia líquida.....	28
Tabela 13 - Diferenças fundamentais entre a separação cromatográfica de fase normal e fase reversa.....	32
Tabela 14 - Vantagens e desvantagens do detetores UV-VIS.....	37
Tabela 15 - Parâmetros de mérito de um método analítico.....	39
Tabela 16 - Tabela de reagentes utilizados.....	49
Tabela 17 - Resultados da análise da homogeneidade de variâncias (1 – 5 e 20 – 40 ppm).....	55
Tabela 18 - Resultados do teste de linearidade do método 1.....	58
Tabela 19 - Sensibilidade do detetor.....	59
Tabela 20 - Valores de S_M e ΔC do método analítico.....	59
Tabela 21 - Seletividade do método 1 para a amostra 1.....	61
Tabela 22 - Seletividade do método 1 para as amostras 3 a 7.....	62
Tabela 23 - Seletividade do método 1 para as amostras 8 a 16.....	63
Tabela 24 - Resultados relativos aos limites analíticos do método 1.....	64
Tabela 25 - Verificação do limite de deteção e quantificação do método analítico.....	64

Tabela 26 - Avaliação da exatidão do método 1 (Biocida A)	66
Tabela 27 - Resultados de ensaios de repetibilidade para o método 1 (Pad. 1, 5, 20 e 40 ppm).....	68
Tabela 28 - Avaliação da aceitabilidade dos resultados de repetibilidade para o método 1	69
Tabela 29 - Resultados da determinação da precisão intermédia para o método 1	70
Tabela 30 - Retas de calibração.....	73
Tabela 31 - Sensibilidade da técnica analítica para os biocidass B – G (métodos 2 – 6)	73
Tabela 32 - Sensibilidade do método de determinação dos biocidas B – G (métodos 2 – 6).....	74
Tabela 33 - Resultados do cálculo de seletividade para o biocida B.....	75
Tabela 34 - Resultados do cálculo de seletividade para o biocida C.....	76
Tabela 35 - Resultados do cálculo de seletividade para o biocida D.....	76
Tabela 36 - Resultados do cálculo de seletividade para o biocida E.....	77
Tabela 37 - Resultados do cálculo de seletividade para o biocida F.....	77
Tabela 38 - Resultados do cálculo de seletividade para o biocida G.....	77
Tabela 39 - Limites analíticos para o método 2.....	78
Tabela 40 - Taxa de recuperação do biocida B quantificado pelo método 2.....	80
Tabela 41 - Taxa de recuperação do biocida C quantificado pelo método 2.....	80
Tabela 42 - Taxa de recuperação do biocida D quantificado pelo método 3.....	81
Tabela 43 - Taxa de recuperação do biocida E quantificado pelo método 4.....	81
Tabela 44 - Taxa de recuperação do biocida F quantificado pelo método 5.....	81
Tabela 45 - Taxa de recuperação do biocida G quantificado pelo método 6.....	82
Tabela 46 - Ensaaios de precisão intermédia para o método 2.....	83
Tabela 47 - Ensaaios de precisão intermédia para o método 3 e 4.....	84
Tabela 48 - Ensaaios de precisão intermédia para o método 5 e 6.....	84

Índice de figuras

Fig. 1 - Ação microbiana e animal em embarcações.....	3
Fig. 2 - Representação estrutural de uma tinta.....	5
Fig. 3 - Estrutura molecular do ácido abiético.....	8
Fig. 4 - Efeitos do crescimento de microrganismos em tintas.....	15
Fig. 5 - Degradação enzimática de resinas.....	15
Fig. 6 - Classificação de biocidas perante a <i>ECHA</i>	17
Fig. 7 - Estrutura molecular do MIT (A), CIT (B) e BIT (C).....	19
Fig. 8 - Estrutura molecular do DCOIT (D) e OIT (E).....	19
Fig. 9 - Estrutura base da família dos carbamatos.....	21
Fig. 10 - Estrutura molecular do IPBC.....	21
Fig. 11 - Estrutura molecular da Bifentrina (A), Cipermetrina (B) e Deltametrina (C).....	22
Fig. 12 - Estrutura molecular de formaldeído.....	24
Fig. 13 - Esquema explicativo de um cromatógrafo líquido.....	26
Fig. 14 - Esquema ilustrativo do funcionamento de uma bomba de êmbolo recíproco. A: Aspiração pelo êmbolo inferior. B: Aspiração pelo êmbolo superior	28
Fig. 15 - Esquema representativo do funcionamento do injetor constituído por uma válvula de 2 vias.....	29
Fig. 16 - Esquema ilustrativo do processo de separação cromatográfica. A: Início da separação cromatográfica, B: Separação cromatográfica numa fase inicial, C: Separação cromatográfica com o primeiro composto distinguido, D: Etapa final da separação cromatográfica com todos os compostos separados	30
Fig. 17 - Fases ligadas mais utilizadas em cromatografia líquida, preparadas a partir da substituição do grupo silanol.....	32
Fig. 18 - Evolução de uma separação cromatográfica acompanhada por um detetor.....	34
Fig. 19 - Processo de medição do sinal analítico.....	35
Fig. 20 - Principais componentes de um detetor UV-VIS.....	36
Fig. 21 - Equações químicas representativas da reação de derivatização de formaldeído com DNPH e pentanodiona.....	38
Fig. 22 - Cromatograma de uma amostra ensaiada contendo o biocida A.....	54
Fig. 23 - Regressão linear de primeiro grau (1-5 ppm).....	56

Fig. 24 - Regressão linear de segundo grau (1-5 ppm).....	56
Fig. 25 - Regressão linear de primeiro grau (20-40 ppm).....	57
Fig. 26 - Regressão linear de segundo grau (20-40 ppm).....	57
Fig. 27 - Representação gráfica da curva de Horwitz (metade da trompeta de Horwitz).....	69
Fig. 28 - Cromatorama de uma amostra ensaiada contendo o biocida F.....	72
Fig. 29 - Cromatograma de uma amostra ensaiada contendo os biocidas B e C (Método 2).....	72

Índice de abreviaturas

A - Absorvância

BIT - 1,2-Benzisotiazolin-3-ona

BBIT - N-Butil-1,2-Benzisotiazolin-3-ona

BFTN - Bifentrina

CIT - 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona

COV - Composto orgânico volátil

CPTN - Cipermetrina

CV_r - Coeficiente de variação em ensaios realizados em condições de repetibilidade

CV_{p.i.(tempo)} - Coeficiente de variação em ensaios realizados em condições de precisão intermédia, onde se variou o dia de análise

CV* - Coeficiente de variação previsto pela equação de *Horwitz* modificada

C18 - Grupo octadecilsilano

DCOIT - 4,5-Dicloro-2-octil-4-isotiazolin-3-ona

DMTN - Deltametrina

DDT - *Diclorodifeniltricloroetano*

ECHA - European Chemicals Agency

FA - Formaldeído

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IPBC - 3-Iodo-2-propinil-N-butilcarbamato

I_{ins.} - Intensidade da radiação incidente

I_{trans.} - Intensidade da radiação transmitida

K - Fator de retenção

l - Comprimento do passo ótico

LOD_M - Limite de deteção do método analítico

LOQ_M - Limite de quantificação do método analítico

LC₅₀ - Concentração letal

MIT - 2-Metil-4-isotiazolin-3-ona

MMPA - 2-Metil-2-(metiltio)propanal

NMC - 1-Naftil-n-metilcarbamato

N - Numero de pratos teóricos

OIT - 2-Octil-4-isotiazolin-3-ona

R - Resolução

S_T - Sensibilidade da técnica instrumental

S_M - Sensibilidade do método analítico

S_C - Desvio padrão da concentração

T_P - Tamanhos de partículas

t_R - Tempo de retenção

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Ultravioleta-visível

W - Largura do pico

ε - Absortividade molar

λ - Comprimento de onda

α - Fator de seletividade

$\frac{S}{N}$ - Razão sinal-ruído

1 Introdução

1.1. Apresentação e objetivo do estágio curricular

Com a diminuição da quantidade de agentes protetores em muitas tintas de base aquosa e seus constituintes, tem vindo a tornar-se preponderante assegurar a sua preservação, de modo a que estas se mantenham estáveis durante todo o seu período de armazenamento e garantam uma adequada proteção ao substrato após a sua aplicação. A proteção é feita através da adição de um ou mais biocidas, os quais são adicionados em pequenas quantidades e tem como função destruir, repelir, ou neutralizar organismos prejudiciais ao desempenho da tinta^[1, 2]. O uso generalizado de biocidas nos mais diversos setores industriais associado ao seu elevado potencial de contaminação dos recursos hídricos durante a sua produção, utilização ou descarga, fez com que os biocidas fossem incluídos na lista de contaminantes emergentes de grande relevância para o ambiente e para a saúde pública. Recentemente foi emitido um regulamento pela união europeia relativo à utilização de biocidas nos mais diversificados setores, que visa melhorar o funcionamento do mercado assegurando simultaneamente a proteção da saúde humana animal e a segurança ecológica^[1]. Este regulamento menciona a importância da redução das quantidades de biocidas utilizados, não deixando que estes percam a sua função. Por esta razão, há todo o interesse em desenvolver métodos que permitam controlar e monitorizar adequadamente os biocidas nas mais variadas matrizes.

O presente trabalho tem por objetivo implementar e validar métodos de análise química de determinação de biocidas em tintas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção UV/Vis. Pretende-se que o método de análise seja extensivo à maioria dos biocidas usados na indústria de tintas.

1.2. CIN - Corporação Industrial do Norte

A CIN - Corporação Industrial do Norte, S.A. fundada a 1917, tem como principal atividade a produção e comercialização de tintas, vernizes e produtos afins. Dedicar os seus produtos aos seguintes setores de mercado: decorativos, indústria, produção anticorrosiva e acessórios. Após ter alcançado a liderança do mercado nacional desde 1992 e do mercado ibérico desde 1995, a empresa expandiu-se para outros locais, sendo atualmente detentora de marcas como Tintas CIN Angola, Tintas CIN Moçambique, SARL; S.A., NITIN, Sotinco, Pinturas CIN Canárias, INPI, Barnices Valentine, Cros Pinturas, CIN Coatings México, Celliose, Monopol, Soritec e a mais recente, GOVESAN. Com as suas várias unidades de fabrico e centros de distribuição, a CIN atingiu um mercado amplo, abrangendo, para além de Portugal, países como Angola, Moçambique, França, México e Espanha. Em 2010, a empresa inaugurou um novo Centro de Investigação & Desenvolvimento na Maia, onde este estágio teve lugar.

1.3. Inserção do tema de trabalho

Todos os anos a degradação de materiais leva ao gasto de milhares de euros na sua manutenção e eventual substituição. Na maioria dos casos, estas ocorrências acontecem em objetos de substituição rápida e barata, no entanto em casos em que a sua substituição acarreta grandes custos (como pontes, máquinas, navios, aeronaves e até veículos de menor porte) a degradação dos materiais demonstra ser um grave problema. A deterioração de substratos pode dar-se de várias formas, desde a oxidação no caso dos metais e das ligas metálicas, passando pelas infestações em madeiras e alguns materiais poliméricos, e até por ação de microrganismos, como bactérias e fungos. É especialmente preocupante a degradação de substratos que se encontram em meios húmidos e quentes, pois estes ambientes potenciam a hidrólise dos materiais não metálicos e a atividade de organismos prejudiciais à conservação e preservação dos mesmos. Devido a tudo isto, com o decorrer dos anos foram desenvolvidos meios de combate à degradação dos materiais, que passam não só pela redução da velocidade de degradação mas também, quando possível, pela completa eliminação do desgaste, seja ele por ação química, biológica ou mecânica.

A proteção dos substratos é feita de várias formas. No caso dos polímeros, devido à sua deterioração ocorrer por ação da reação de hidrólise, desenvolveram-se polímeros capazes de suportar gamas de pH elevadas e cujas ligações conseguem suportar ataques enzimáticos^[3]. Já nos casos das madeiras, visto serem polímeros

naturais, passaram a ser revestidas por vernizes capazes de impedir o alojamento e a proliferação de insetos e fungos, evitando também a absorção de água. No caso de metais e ligas metálicas, desenvolveram-se materiais dopados capazes de resistir à oxidação, sendo que, neste caso, também foram descobertos compósitos metálicos que, com a própria oxidação criam uma camada protetora que impede o prolongamento da corrosão.

Devido à natureza orgânica de produtos como cremes e cosméticos, estes também sofrem degradação. Infelizmente, esta deterioração dá-se a uma velocidade elevada e ocorre maioritariamente graças à ação microbiológica. Organismos como bactérias e fungos utilizam assim a matéria orgânica não só como fonte de nutrientes, mas também como substrato na qual podem proliferar. No caso particular dos alimentos, a sua preservação é feita através do seu isolamento, ou adicionando biocidas que combatem a ação microbiológica. O uso de pesticidas e inseticidas na agricultura, são um exemplo de preservantes aplicados a alimentos que não podem ser isolados do meio ambiente.

Casos gritantes de degradação de substratos, como em embarcações, provam ser um problema de difícil resolução. Devido ao contacto direto e quase constante com rios e mares, os veículos marinhos servem de substrato para a proliferação de bactérias, plantas e animais. Esta ação animal e microbiológica, para além de acrescentar peso à embarcação, também reduz o seu tempo de vida, tornando-as menos eficazes (Figura 1)^[4]. Está estimado que, em média, o consumo de combustível suba em 6% por cada 100 µm de superfície incrustada.^[5, 6]

Também em hospitais é preponderante haver cuidado com a degradação de materiais por ação bacteriana ou fúngica. Neste caso em particular, a degradação é um fator importante, pois indica possíveis focos



Figura 1: Ação microbiana e animal em embarcações^[4]

de contaminação. Utensílios como bisturis, tesouras e agulhas devem estar sempre devidamente esterilizados, uma vez que o seu contacto com o ser humano é frequente em operações de elevado risco de contágio. Para além disso, tendo em conta o débil

estado de saúde de vários pacientes, é necessário impedir o contacto com microrganismos que possam comprometer o seu bem-estar.

2 Tintas

Segundo a norma portuguesa NP 41, as tintas são um produto de pintura com composição pigmentada líquida, em pasta ou em pó, que quando aplicada em camada fina sobre um substrato, no estado em que é fornecida ou após diluição, dispersão em produtos voláteis ou fusão, é convertível ao fim de um certo tempo, numa película sólida, contínua, corada e opaca. Podem ser aplicadas nos mais variados produtos, desde madeiras, a polímeros, betões e até em ligas metálicas.

De uma maneira geral, as tintas são classificadas como misturas homogéneas e complexas de veículos (também chamadas de resinas ou ligantes), pigmentos, cargas, aditivos e solventes.

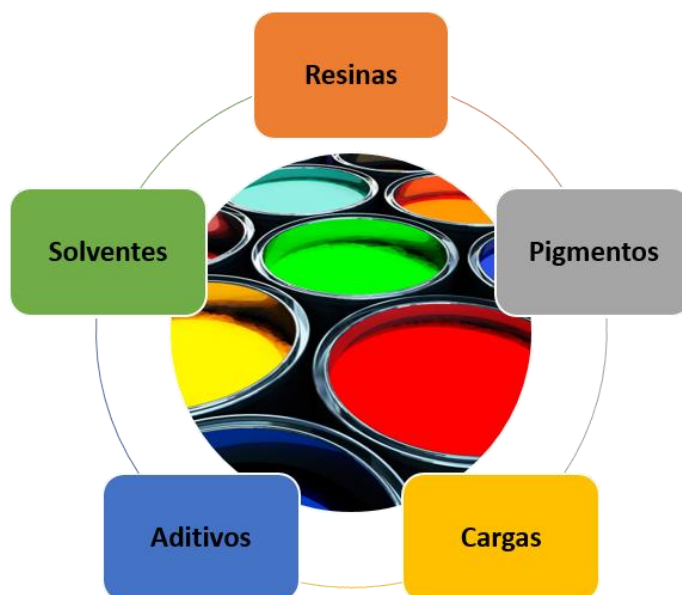


Figura 2: Representação estrutural de uma tinta

Alguns destes constituintes, embora sejam importantes, não são essenciais à formulação de uma tinta. Exemplos como as tintas em pó, bastante utilizadas, são tintas que não contêm solventes e, por isso, não causam poluição atmosférica provocada pela presença dos solventes não aquosos. Estas são apresentadas nas condições de aplicação, dispensando a preparação e evitando erros na diluição. O mesmo acontece com as tintas para interiores, que dispensam muitos aditivos e resinas que conferem resistência à radiação ultravioleta (UV)^[7].

Deste modo, cada tinta é formulada de acordo com as necessidades da sua aplicação. A escolha dos seus constituintes e combinações varia conforme as condições ambientais a que estará sujeita (Tabela 1). No entanto, as propriedades finais da tinta não só dependem da sua composição, mas também do modo, quantidade e sequência de adição dos seus aditivos. É otimizando todos estes fatores que se torna possível obter as propriedades pretendidas para cada tipo de aplicação.

Tabela 1: Definições segundo a norma ISO 4618:2014 - Tintas e Vernizes (Termos e definições)^[8]

Componente	Definição
Resinas	Produto macromolecular, geralmente amorfo, de consistência que varia entre o estado sólido e o estado líquido.
Pigmentos	Material corante, geralmente na forma de partículas finas, que é praticamente insolúvel no meio de suspensão e que é utilizado devido às suas propriedades óticas, protetoras e/ou decorativas.
Cargas	Material sob a forma de grânulos ou de pó, insolúvel no meio de suspensão e utilizada para modificar ou influenciar determinadas características físicas.
Solventes	Líquido simples ou mistura de líquidos, volátil sob determinadas condições de secagem, e no qual o ligante é solúvel.
Aditivos	Qualquer substância adicionada em pequenas quantidades a um produto de pintura, para melhorar ou modificar uma ou mais propriedades.

Com a utilização de revestimentos não só se tornou possível impedir o contacto de bactérias, fungos e insetos com os vários substratos, como também protegê-los da sua oxidação e hidrólise. Assim, promove-se um maior tempo de vida do material, visto que a sua degradação só se inicia quando o revestimento está total ou parcialmente degradado.

É, deste modo, importante escolher um revestimento adequado ao substrato e ambiente ao qual vai estar exposto, de forma a prolongar ao máximo o tempo útil do material. Atualmente, esta é uma das principais formas de proteção usadas na indústria, havendo naturalmente um grande desenvolvimento nesta área. Isto prende-se ao facto de serem produtos de baixo custo, com múltiplas aplicações e capazes de reduzir em larga escala os gastos com a manutenção e substituição dos substratos. Perante isto, as tintas são, muitas vezes, usadas em combinação com outras formas de proteção e

podem servir não só para proteger, como para adornar peças específicas, paredes interiores e exteriores ou até mesmo veículos inteiros^[9]. Também são frequentemente usadas tintas para conferir características funcionais aos substratos, como por exemplo o revestimento de pavimentos.

2.1. Resinas

A resina, mais conhecida por ligante ou veículo, é o componente responsável pela formação da película e pela maior parte das suas características físicas e químicas. Segundo a norma ISO 4618:2014 - Tintas e Vernizes (Termos e definições), a resina é um material amorfo cujo estado físico varia entre sólido e líquido^[8]. Tem por função aglutinar os vários componentes e influencia fortemente as propriedades da tinta, como a sua flexibilidade, brilho, durabilidade e compatibilidade com o substrato.

De modo a garantir um compromisso entre as todas as características desejadas, é geralmente aplicado mais do que uma resina na formulação da tinta. Existe uma grande variedade de resinas que se podem utilizar conforme a sua origem natural ou sintética. A colofónia é um exemplo de uma resina natural, que se destina a proteger superfícies de madeiras. É composta maioritariamente por ácido abiético, cuja fórmula de estrutura está representada na Figura 3, que apresenta uma boa resistência à oxidação^[10]. Também existem resinas de elevada massa molecular como as resinas de borracha clorada. Estas são obtidas por modificação química da borracha natural e conferem grande resistência à água, sendo utilizadas muitas vezes em ambientes marinhos.

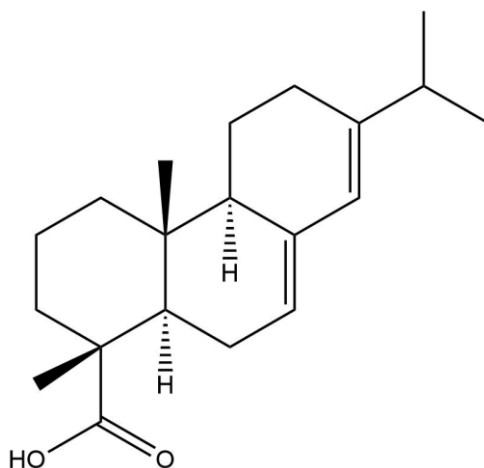


Figura 3: Estrutura molecular do ácido abiético

Quando comparadas com as resinas naturais, as resinas sintéticas apresentam maior resistência térmica, química e à radiação. Devido a isso, estas são utilizadas maioritariamente em revestimentos contrafogo, contra a corrosão e até mesmo para proteção contra a radiação UV.

Tendo isto em conta, é preponderante escolher adequadamente a resina para a formulação da tinta. Por vezes devido ao objetivo da utilização da tinta e às condições a que elas estão sujeitas, torna-se difícil a aplicação de certas resinas. Para tal, é necessário conhecer as características das resinas sintéticas e naturais atualmente utilizadas.

De uma forma geral, as resinas sintéticas são classificadas de acordo com a natureza do polímero que as constituem, tal como é salientado pela Tabela 2.

Tabela 2: Resinas sintéticas mais utilizadas em formulações de tintas

Resinas	Monómeros	Propriedades
Resinas acrílicas	Acrílicos, metacrílicos e acrilonitrilo	Boa resistência química e à degradação por radiação solar, elevado brilho
Resinas alquídicas	Ácidos gordos, polióis, poliácidos	Resistência à humidade e química variável com o comprimento da cadeia alquídica
Resinas epoxídicas	Grupos epóxi, aminas, ácidos carboxílicos	Boa aderência e elevada resistência à humidade e resistência química
Resinas fenólicas	Fenois, aldeídos	Elevado brilho e resistência à água
Poliésteres	Poliácidos, polióis	Boa reticulação das cadeias, geralmente utilizados em tintas em pó
Poliuretanos	Isocianatos polifuncionais, alcoois	Películas duras, elevado brilho, excelente resistência química
Resinas vinílicas	Acetato de vililo, cloreto de vinilo, acrilatos	Aumento da capacidade de repintura, aumento da resistência química e à humidade com o número de monómeros vinílicos
Resinas de silicone	siloxanos	Excelente resistência térmica e climática, elevado brilho,

As resinas também são classificadas sob o seu processo de cura, que pode dar-se por evaporação do solvente, coalescência, polimerização ou reticulação cruzada.

2.2. Pigmentos

Os pigmentos são partículas insolúveis no meio de dispersão, podendo ser ativos (conferir cor) ou inertes (cargas). Os pigmentos são utilizados maioritariamente para conferir cor à tinta, no entanto, em conjunto com as cargas, também influenciam o brilho, a permeabilidade da película e a resistência desta à radiação e ao calor. Podem classificar-se em orgânicos e inorgânicos. Embora os pigmentos orgânicos tenham geralmente cores mais vivas, brilhantes e menos opacas, estes apresentam menos resistência quando aplicados no exterior e expostas a condições atmosféricas agressivas. Devido a serem substancialmente mais caros e apresentarem maior tendência para sofrer sangramento, são normalmente substituídos por pigmentos inorgânicos, nomeadamente os que são referidos na Tabela 3, que demonstram uma maior estabilidade quer térmica, quer à ação da radiação solar.

Para melhorar a ação protetora da película de tinta por vezes utilizam-se pigmentos com propriedades de impermeabilidade, anticorrosivas e até com cores próprias para uma maior reflexão da luz. No caso das tintas para exteriores, normalmente recomenda-se a utilização de brancos, como forma de reduzir o aquecimento das paredes.

Tabela 3: Pigmentos inorgânicos usados na formulação de tintas

Pigmento	Fórmula química	Cor
Óxido de ferro (II) e (III)	FeO; Fe ₂ O ₃	Castanho, esverdeado, Amarelo, vermelho e preto
Dióxido de titânio	TiO ₂	Branco
Óxido de zinco	ZnO	Branco
Cromato de chumbo	PbCrO ₄	Vermelho, laranja, amarelo
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄	Amarelo e laranja

2.3. Cargas

As cargas são materiais comercializados sob a forma de grânulos ou pó. São muito pouco solúveis no meio de suspensão e utilizadas para modificar ou influenciar propriedades como a permeabilidade da película, a resistência química, o brilho, a resistência à abrasão e o comportamento anticorrosivo. Por vezes, devido às características intrínsecas de algumas cargas, estas podem também conferir propriedades particulares às tintas, como por exemplo torná-las antiderrapantes ou resistentes ao fogo.

A tonalidade da carga varia de branca a cinzenta dependendo do composto que a forma e da quantidade de impurezas que elas contêm. São partículas que podem influenciar a cor final da tinta, sendo que as cargas acinzentadas tornam a tinta mais escura e dificultam a obtenção de brancos puros e tons intensos. Também é possível, diminuindo o tamanho da partícula, aumentar a opacidade da tinta.

As cargas dividem-se atendendo à sua origem, natural ou sintética, sendo algumas das mais utilizadas referidas na Tabela 4.

Tabela 4: Cargas mais usadas na formulação de tintas^[11]

Carga	Fórmula química	Propriedades
Diatomite	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃	Grande área superficial e porosidade
Oxido de silício	SiO ₂	Elevado brilho, baixo índice de refração
Sulfato de bário	BaSO ₄	Bom brilho, baixo poder de absorção de óleos
Carbonato de cálcio	CaCO ₃	Elevado brilho, reduzida abrasividade
Silicato de magnésio	MgO ₃ Si	Inerte, elevado poder anticorrosivo
Silicato de alumínio	Al ₂ SiO ₅	Elevada opacidade

2.4. Solventes

O solvente apresenta-se normalmente no estado líquido à temperatura ambiente. É o elemento responsável pela dispersão dos vários constituintes das tintas e, juntamente com outros componentes como a resina, é também responsável pela sua viscosidade. Através da adição do solvente é ainda possível ultrapassar algumas incompatibilidades que por vezes se observam entre compostos presentes na tinta. Depois da tinta ser aplicada, o solvente evapora-se durante o período de secagem, possibilitando a formação da película sólida protetora. Nas formulações das tintas podem ser utilizados dois tipos de solventes:

- Não aquosos: Hidrocarbonetos voláteis (tintas de base solvente) como por exemplo compostos alifáticos, aromáticos, álcoois ou cetonas;
- Água (Solvente principal das tintas de base aquosa).

Devido ao impacto ambiental que a libertação de compostos orgânicos voláteis (COV's) provoca, o uso de tintas de base solvente está gradualmente a ser reduzido e como tal, a ser substituído pela aplicação, cada vez maior, de tintas de base aquosa e de tintas em pó.

As tintas de base aquosa apresentam-se como sendo uma boa alternativa, no entanto devido à água ser um bom meio para a proliferação de organismos, estas tintas são mais facilmente atacadas por microrganismos, como os que são referidos na Tabela 5, e insetos, degradando-se rapidamente e por isso tendo um menor tempo de armazenamento. Este problema é muitas vezes ultrapassado pela adição de substâncias que consigam proteger a tinta da sua degradação.

Tabela 5: Exemplos de microrganismos responsáveis pela degradação de tintas de base aquosa^[12]

Bactérias	Fungos	Bolores
<i>Alcaligenes species</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Penicillium spp.</i>	
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Bacillus cereus</i> ^[13]	

2.5. Aditivos

De acordo com a norma ISO 4618:2014 - Tintas e Vernizes (Termos e definições), os aditivos são “*substâncias incorporadas em pequenas quantidades nas tintas, vernizes e produtos similares com o fim de lhes melhorar ou de alguma forma mudar acentuadamente as suas características*”. São normalmente líquidos viscosos ou sólidos sob o aspeto de um pó fino, que podem ser dissolvidos no veículo e são adicionados à tinta em quantidades inferiores a 5% da sua massa.

Assim, estas substâncias são utilizadas de acordo com a conveniência do formulador da tinta e conferem propriedades físicas e/ou químicas que a tornam mais eficaz nas condições da sua aplicação. Desempenham por isso um papel fulcral na formulação da tinta. Fazem parte deste grupo um conjunto alargado de substâncias que, como representado na Tabela 6, são divididas pela sua função.

Tabela 6: Classificação de aditivos de acordo com a sua função na tinta^[8]

Aditivo	Função
Absorventes de luz	Estabilizadores do comportamento dos revestimentos expostos à luz solar e aos raios UV
Agentes anti-pele	Impedir a formação de peles à superfície dos produtos nas embalagens, durante a armazenagem
Agentes anti-espuma	Diminuir ou evitar a formação de espumas indesejáveis
Agentes tixotrópicos	Promover aumento de viscosidade nos produtos
Algicidas	Evitar os efeitos da degradação por algas
Anti-sedimentantes	Evitar a deposição dos pigmentos e cargas, durante a armazenagem dos produtos
Bactericidas	Evitar os efeitos da degradação por bactérias
Coalescentes	Diminuir a temperatura mínima de formação de película (TMFP)
Desidratantes	Conservar um baixo teor de humidade no interior da lata durante a armazenagem.
Dispersantes	Facilitar a dispersão dos produtos pulverulentos nos veículos
Espessantes	Provocar um aumento de consistência
Fungicidas	Evitar os efeitos da degradação por fungos
Inseticidas	Evitar os efeitos da degradação por insetos
Inibidores de corrosão	Prevenir a corrosão
Molhantes	Diminuir a tensão interfacial entre a fase sólida e a fase líquida
Plastificantes	Conferir elasticidade, aumentar e manter a flexibilidade da película
Secantes	Provocar uma apreciável redução do tempo de secagem à temperatura ambiente

O tempo de vida da película sólida, formada após a secagem da tinta, não só é delimitado pelas condições da sua aplicação, mas também pela degradação que a tinta poderá eventualmente sofrer antes de ser aplicada no substrato. Estão sempre presentes um reduzido número de bactérias nas tintas que, em geral, não se desenvolvem nem causam problemas de degradação em tintas de base solvente. No

entanto, devido às bactérias e fungos encontrarem as condições ideais para a sua reprodução em tintas de base aquosa, estes podem desenvolver-se, tendo um crescimento exponencial^[14]. O desenvolvimento destes microrganismos faz-se sentir pela alteração de viscosidade (normalmente perda), alteração de pH, maus odores, descoloração, aparecimento de biofilmes e produção enzimática (Figura 4) que, tal como representado na Figura 5, leva a quebras dos polímeros em monómeros e consequentemente a um aceleração da degradação da tinta^[12].

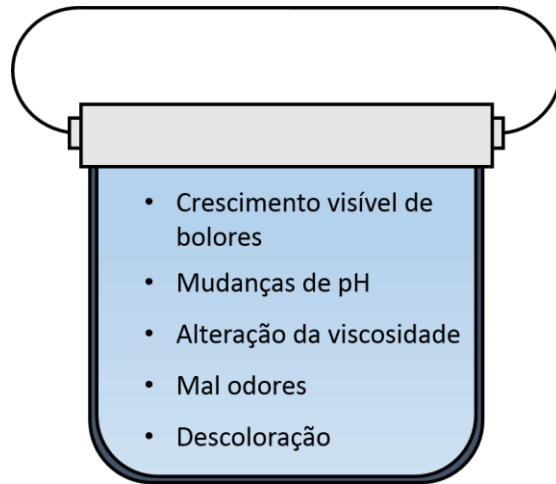


Figura 4: Efeitos do crescimento de microrganismos em tintas

Caso esta deterioração se note e a tinta já esteja danificada em grande escala, a sua aplicação resulta numa má adesão ao substrato, provocando falhas na sua superfície que levam a um possível contacto entre o meio ambiente e o substrato. Assim sendo, são regularmente usadas substâncias (aditivos) que protegem o revestimento final desde a produção da tinta e colocação no mercado até à sua aplicação e posterior secagem. Os produtos biocidas são um exemplo de substâncias usadas para este fim, sendo adicionados às tintas sob a forma de inseticidas, bactericidas, fungicidas e algicidas.

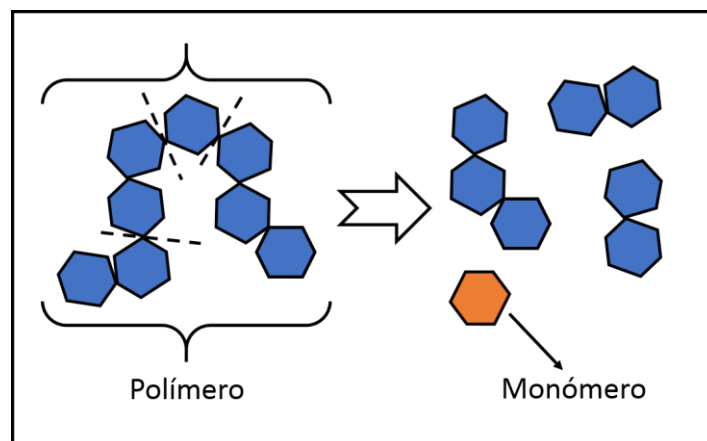


Figura 5: Degradação enzimática de resinas

3 Biocidas

Produtos biocidas, de acordo com o Regulamento (UE) N.º 528/2012 do parlamento europeu e do conselho de 22 de maio de 2012, relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas, são “*substâncias ativas e preparações que contenham uma ou mais substâncias ativas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, que se destinam, por mecanismos químicos ou biológicos, a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a ação de um organismo prejudicial*”. Perante o mesmo documento, substâncias ativas são definidas como “*substâncias ou microrganismos que exerçam uma ação sobre ou contra organismos prejudiciais*”.

Os biocidas dividem-se, de acordo com a ECHA – European Chemicals Agency, em 4 grupos:

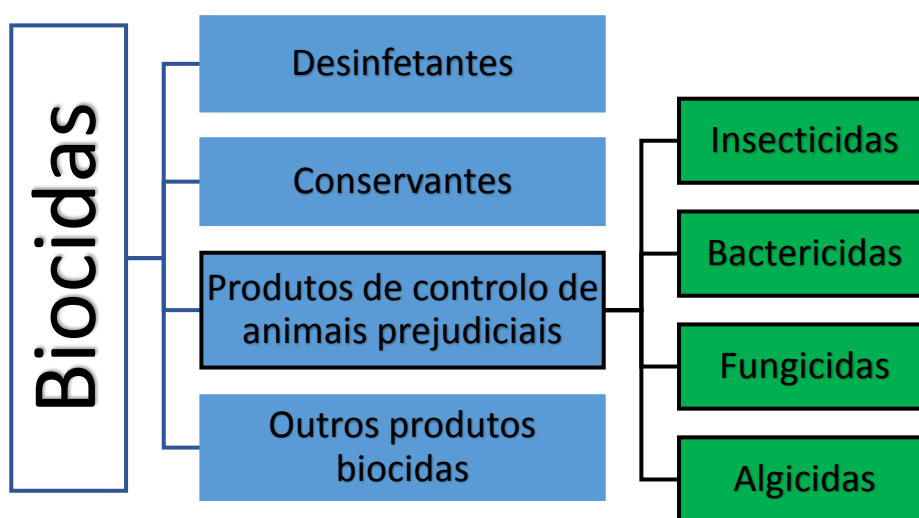


Figura 6: Classificação de biocidas perante a ECHA

Atualmente utilizam-se biocidas nas mais variadas aplicações, desde madeiras, plásticos, tintas e mobiliário (bactericidas e fungicidas), passando pela agricultura e por toda a produção e tratamento de alimentos (pesticidas), e até em veículos como embarcações (algicidas). Muitas vezes, para um mesmo fim é necessário a proteção contra mais do que um tipo de organismo. Devido a isso, a utilização de mais do que um biocida em produtos é algo frequentemente observado. Para além disso, existem biocidas com efeito sinérgico quando misturados, tal como acontece com a mistura dos biocidas 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona e 2-Metil-4-isotiazolin-3-ona (CIT/MIT) que

apresenta uma maior estabilidade e atividade antimicrobiana do que os biocidas isolados^[15]. É devido às suas mais diversas aplicações e aos benefícios do seu uso que os biocidas têm uma grande importância na sociedade atual.

Porém, uma substância ativa deve preencher alguns requisitos para poder ser usada como biocida, nomeadamente^[12]:

- Ter atividade contra uma larga gama de microrganismos;
- Ser economicamente viável quando comparado com a quantidade utilizada;
- Reagir rapidamente com os microrganismos, tornando-os inofensivos;
- Ser estável a elevadas gamas de temperatura;
- Ser estável a condições de pH alcalino (pH 8-9,5);
- Não reagir com os vários constituintes do produto;
- Sem odor ou com odor fraco;
- Baixa toxicidade;
- Solúvel em água e óleo.

No entanto, devido às características intrínsecas de um biocida, estes podem atacar não só os organismos alvo, como também todos os outros que se pretende preservar. É este comportamento pouco seletivo que faz com que o biocida, quando em contacto com o corpo animal (em especial humano) ou vegetal, possa também atacar as suas células, em particular quando ocorre em grandes quantidades, provocando eczemas, irritações cutâneas ou até mesmo a morte^[16, 17]. Como exemplo, na europa, em 2000 foram encontrados casos clínicos de sensibilização provocados pelo uso de formaldeído (FA), 2-Metil-4-isotiazolin-3-ona (MIT) e 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CIT) como biocidas^[18]. Por causa das suas propriedades estes compostos podem contaminar meios aquosos como rios ou mares e meios laborais como laboratórios ou secções de empresas (contaminações por FA no ar). Representam por isso uma potencial ameaça ao ecossistema quando usados em quantidades excessivas e sem qualquer controlo. Perante os riscos inerentes à produção e manuseamento de biocidas, é importante referir que deve haver um compromisso entre a sua utilização e os efeitos que esta pode trazer à saúde humana e ao ecossistema.

Em suma, é imperativo definir políticas e princípios de precaução nas empresas que produzem e/ou utilizam produtos biocidas. Torna-se também importante o desenvolvimento de novos biocidas e novas formas de aplicação, a fim de desenvolver melhores formas de proteção sem causar dano ao meio ambiente.

3.1. Biocidas atualmente utilizados em tintas

3.1.1. Izotiazolonas

Devido a não existir uma substância ativa passível de neutralizar todos os organismos e capaz de resistir a todas as condições adversas proporcionadas pelo meio ambiente, é muitas vezes ponderada a adição de mais do que uma substância ativa na formulação de uma tinta. Os compostos pertencentes à família das isotiazolinonas, devido a apresentarem características importantes e muitas vezes complementares, são biocidas frequentemente utilizados na indústria. As isotiazolinonas travam o crescimento microbiológico através de uma rápida inibição do crescimento e metabolismo celular (basta alguns minutos), seguida de danificação irreversível da membrana celular (várias horas)^[19].

Fazem parte desta família compostos como 2-Metil-4-isotiazolin-3-ona (MIT), 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CIT) e 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT), frequentemente vendidos sob a forma de mistura MIT/BIT num rácio 1:1 ou CIT/MIT numa proporção 3:1^[20]. As estruturas moleculares do MIT, CIT e BIT estão representadas na Figura 7. O MIT é o composto mais estável, no entanto também é aquele com menor eficiência. Apesar do seu baixo desempenho antimicrobiano, quando misturado com o CIT ou o BIT observa-se um efeito sinérgico. Assim, ambas as misturas são mais estáveis do que as três substâncias ativas sozinhas e apresentam um largo espectro de atividade microbiológica (Bactérias gram +/-)^[21]. Com o uso de MIT/BIT ou CIT/MIT torna-se também possível reduzir a quantidade de biocidas necessária para proteger a tinta.

Para além do MIT, BIT e CIT, são ainda utilizados mais dois biocidas da classe das isotiazolonas na proteção de tintas, que são a 4,5-dicloro-2-octil-4-isotiazolin-3-ona (DCOIT) e 2-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT),

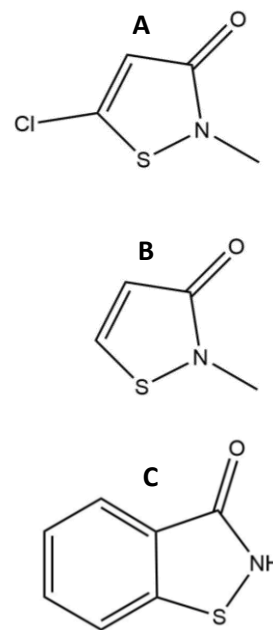


Figura 7: Estrutura molecular do MIT (A), CIT (B) e BIT (C)

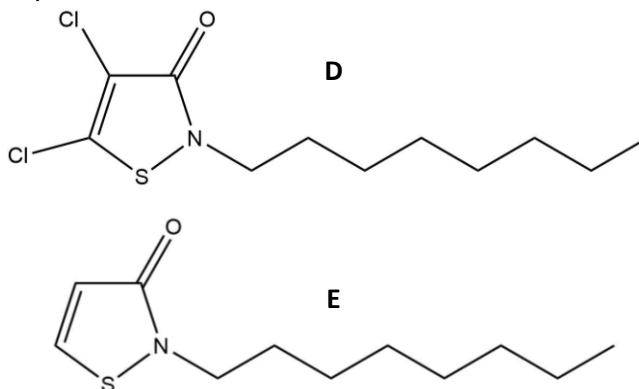


Figura 8: Estrutura molecular do DCOIT (D) e OIT (E)

cuja estrutura molecular está representada na Figura 8. Estes compostos são usados maioritariamente como fungicidas, embora também tenham propriedades bactericidas^[19]. Ambos apresentam boa estabilidade e atividade antimicrobiana devido à cadeia hidrofílica lateral. Na Tabela 7 estão sistematizadas as funções e as propriedades características dos biocidas da classe das isotiazolonas.

Tabela 7: Propriedades e função de alguns biocidas da classe das isotiazolonas^[14, 19, 22]

Biocida	Função	Características
MIT	Bactericida	Biocida estável, para proteção duradoura, pouco eficaz
CIT	Bactericida, fungicida	Biocida de largo espetro, bastante reativo, efeito de curto prazo
BIT	Bactericida e fungicida	Biocida estável e de largo espetro, proteção a longo prazo
DCOIT	Fungicida, bactericida e algicida	Biocida estável e eficaz contra a maior parte de fungos, bolores e bactérias
OIT	Fungicida e bactericida	Biocida estável e eficaz contra a maior parte de fungos, bolores e bactérias

No entanto também existem outros biocidas de menos relevância pertencentes a esta família, nomeadamente o N-butil-1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BBIT). Embora não exista muita documentação sobre o uso de BBIT, este biocida poderá futuramente ser utilizado na proteção contra organismos prejudiciais^[22].

3.1.2. Carbamatos

Os compostos pertencentes à família dos carbamatos são também utilizados como biocidas, mais concretamente como inseticidas. A sua ampla utilização deve-se à sua eficiência no controlo de insetos e também ao facto de terem uma degradação relativamente rápida após a aplicação^[23]. Estes são metabolizados pelos seres vivos e, por isso não se acumulam no tecido adiposo^[24]. Porem, estes compostos degradam-se facilmente em ambientes húmidos e quentes.

Os carbamatos, cuja estrutura molecular está representada na Figura 9, atuam sobre insetos a nível neuronal, inibindo uma enzima fulcral ao correto funcionamento do sistema. Assim, o inseto acaba por perecer em consequência da perda de atividade neuronal.

Estes compostos atuam também em mamíferos, podendo ser potencialmente perigosos para o ser humano.

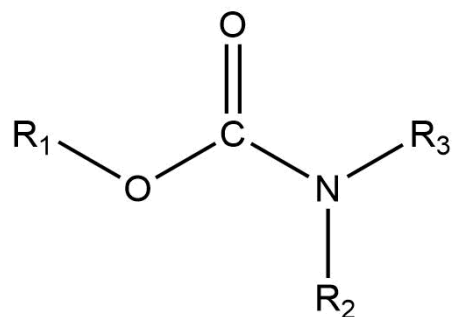


Figura 9: Estrutura base da família dos carbamatos

Um dos carbamatos mais usados como biocida é o 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamato (IPBC), cuja fórmula de estrutura está representada na Figura 10, sendo frequentemente utilizado em formulações de tintas como inseticida e fungicida. O IPBC protege a tinta contra uma grande variedade de fungos e bolores, sendo particularmente importante na proteção da película seca que resulta da aplicação de tintas interiores.

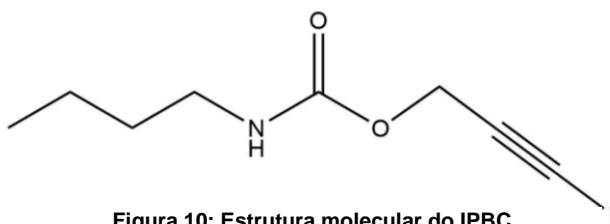


Figura 10: Estrutura molecular do IPBC

Embora se utilize em grande escala IPBC na proteção de tintas, existem outros compostos pertencentes à família dos carbamatos que também são utilizados como biocidas. Destaca-se a utilização de 2-Metil-2-(metiltio)propanal (MMPA) e de 1-naftil-n-metilcarbamato (NMC) na indústria agrícola para proteção dos produtos agrícolas contra diversas pragas.

3.1.3. Piretroides

Embora não utilizados em Portugal, os compostos pertencentes à família dos piretroides continuam a ter um papel importante na indústria agrícola, na ciência forense, hospitais e na proteção de tintas, permanecendo como princípio ativo de muitos inseticidas e pesticidas^[25]. São poderosos inseticidas que atuam a nível cerebral, paralisando e matando uma vasta gama de insetos^[26]. Embora tenham uma toxicidade relativamente baixa para os mamíferos, estes compostos quando presentes na água demonstram toxicidade aguda para a fauna e flora aquática. Os piretroides foram sintetizados entre 1973-1977^[25] e surgiram no circuito comercial no início dos anos 80 do século passado como uma alternativa àqueles de maior potencial tóxico. Merecem destaque pela sua utilização na agricultura a cipermetrina (CPTN), a bifentrina (BFTN) e a deltametrina (DMTN), cujas estruturas moleculares estão esquematizadas na Figura 11 e os nomes IUPAC mencionados na Tabela 8.

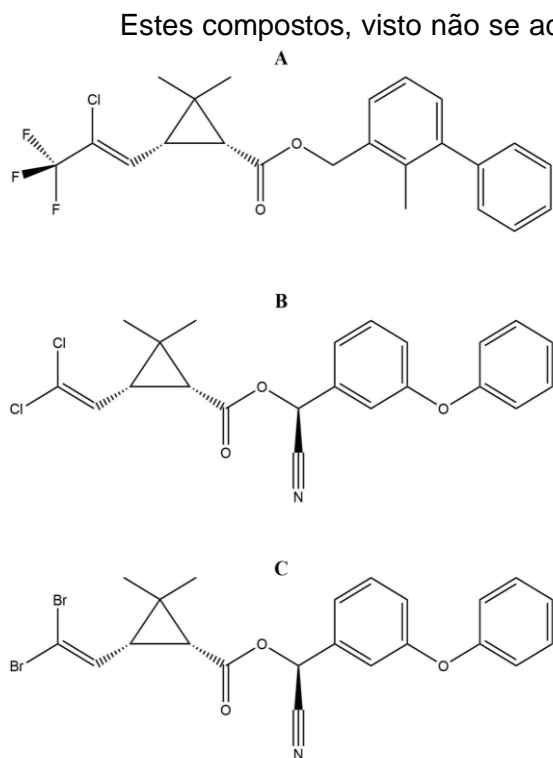


Figura 11: Estrutura molecular da Bifentrina (A), Cipermetrina (B) e Deltametrina (C)

no meio ambiente, apresentaram uma boa alternativa a biocidas de maior toxicidade como o diclorodifeniltricloroetano (DDT). No entanto, já foram relatados casos da presença destes compostos em produtos alimentares (Tabela 10). Apesar desta família de compostos apresentar toxicidade reduzida para os mamíferos, o seu contacto a longo prazo com o ser humano pode causar efeitos adversos.

Estes biocidas são bastante sensíveis à radiação solar e à água, degradando-se rapidamente em ambientes húmidos e de forte

luminosidade. Embora sejam biocidas instáveis, apresentam valores de concentração letal (LC_{50}) bastante reduzidos para uma série de espécies, como se pode testemunhar pelos valores de LC_{50} referentes à bifentrina para várias espécies citadas na Tabela 9. Podendo não só afetar espécies marinhas, como também aves e répteis.

Tabela 8: Nomenclatura relativa aos três piretroides mais relevantes

Nome IUPAC	Nome comercial
2-Metil-3-(difetil)metil (1S,3S)-3-[(Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil]- 2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato	Bifentrina
[Ciano-(3-fenoxifenil)metil]3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato	Cipermetrina
[(S)-Ciano-(3-fenoxifenil)-metil] (1R,3R)-3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetil-ciclopropano-1-carboxilato	Deltametrina

Tabela 9: Concentrações letais para uma série de espécies perante bifentrina

Espécie	LC ₅₀	Referência
<i>Anas platyrhynchos</i>	1280 ppm	[27, 28]
<i>Colinus virginianus</i>	4450 ppm	[27, 28]
<i>Daphnia magna</i>	1,60 ppb	[29]
<i>Apis mellífera lingustica</i>	16,7 ppm	[30]
<i>Mysidopsis bahia</i>	3,97 ppt	[28]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,15 ppb	[31]
<i>Cyprinus carpio L.</i>	57,5 ppb	[32]

Tabela 10: Teores de cipermetrina, bifentrina e deltametrina em produtos alimentares.

Biocida	Alimento	Valor encontrado	Referência
CPTN	Tomate	0,18 ppm; 3,0 ppm	[33, 34]
	Fast food e refrigerantes	1,6 ppb	[35]
	Chá	20,13 ppb – 0,14 ppm	[36]
BFTN	Chá	14,25 ppb – 3,0 ppm	[36]
	Fast food e refrigerantes	1,8 ppb	[35]
	Ovos comercializados	0,25 ppm – 4,11 ppm	[37]
	Ovos do aviário	1,58 ppm -5,81 ppm	[37]
DMTN	Fast food e refrigerantes	1,9 ppb	[35]

3.1.4. Formaldeído

Atualmente existe uma grande preocupação com o uso de formaldeído (FA) e de libertadores de formaldeído. No seu estado natural à temperatura de 25 °C e pressão de 1 atm, o FA apresenta-se sob a forma de um gás incolor, cujo odor é reconhecível por humanos em concentrações inferiores a 1 ppm^[38]. Devido à sua elevada solubilidade em água, o FA é comercializado praticamente sob a forma de soluções aquosas. Na Figura 12 está representada a sua estrutura molecular.

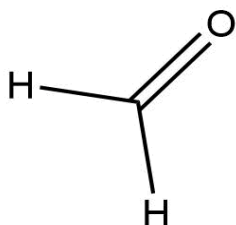


Figura 12: Estrutura molecular de formaldeído

Devido à sua volatilidade, o FA escapa facilmente de materiais como cortiças, adesivos, vernizes e tintas, o que faz dele um tóxico normalmente presente em ambientes domésticos e que se revela ser bastante perigoso para a saúde humana devido à sua elevada reatividade^[39, 40]. De uma forma geral, o formaldeído penetra no corpo humano através da mucosa nasal ou oral, onde acaba por se depositar e/ou ser absorvido^[38]. Já existem vários estudos sobre o impacto que este composto tem na saúde humana e já são conhecidos os efeitos que advêm do contacto com FA. O formaldeído é um conhecido carcinogénico que potencia doenças como asma, hipertensão e doenças neurodegenerativas^[41-44]. Para além destes efeitos este composto também é tóxico para os fetos em desenvolvimento^[42].

O FA tem propriedades bactericidas, fungicidas e inseticidas. Embora não seja utilizado diretamente na formulação de tintas, a sua presença está assegurada sob a forma de libertadores de FA que, em conjunto com outros biocidas, demonstra uma boa atividade antimicrobiana. Para além disso, os biocidas da família da isotiazolona favorecem de uma estabilização acrescida na presença de FA^[15, 45] por este ocupar e simultaneamente proteger a atmosfera no interior da embalagem de tinta^[46].

De notar que nem sempre os teores de formaldeído numa tinta são suficientemente elevados para acentuarem a atividade antimicrobiana dos biocidas. Por vezes na formulação da tinta são também utilizados captadores de formaldeído como acontece com as resinas que polimerizam consumindo formaldeído, nomeadamente as resina melamínica e fenol-formaldeído (baquelite)^[47, 48].

4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou, do inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC), é uma técnica de separação cromatográfica usada em larga escala para separar, identificar e quantificar quando hifenada com um detetor e purificar compostos (cromatografia líquida preparativa, bastante utilizada na purificação e isolamento de produtos químicos). Esta separação tem por base a interação seletiva entre os constituintes da amostra, a fase móvel (composta por um solvente ou uma mistura de vários, também chamada de eluente) e a fase estacionária presente na coluna. Em geral, um cromatógrafo líquido é composto por vários componentes que se encontram descritos na Tabela 11.

Tabela 11: Principais constituintes de um cromatógrafo líquido

Componente	Função
Reservatório de solventes	Parcela do sistema onde se situam os eluentes ou os solventes/soluções usados na preparação do eluente.
Bomba	Componente responsável pela mistura dos vários eluentes e bombeamento da fase móvel
Loop	Tubo capilar de aço usado como reservatório da amostra após a sua recolha e antes da injeção. O <i>loop</i> é esvaziado para injetar a amostra no fluxo contínuo de fase móvel
Injetor	É este componente que faz a recolha de um volume predefinido de amostra para o <i>loop</i> e a sua posterior injeção na fase móvel
Coluna cromatográfica	Parcela do sistema cromatográfico onde se dá a separação cromatográfica dos vários analitos.
Detetor	Componente importante cuja função é detetar e medir uma propriedade física relacionável com a quantidade de analito. (Entre outras a absorvância e refração de radiação, fluorescência e condutividade)
Reservatório de resíduos	Recolhe os resíduos resultantes da eluição da fase móvel e injeção da amostra

Estes componentes estão sequencialmente dispostos no cromatógrafo líquido tal como representado na Figura 13.^[49]

A par com a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de grande impacto na separação de substâncias pouco voláteis e com aplicação em matrizes de complexidade variada. A técnica de HPLC quando hifenada com detetores diversos apresenta, entre outras vantagens, limites de deteção suficientemente baixos e que poderão atingir a ordem de grandeza de 10^{-9} g, uma boa sensibilidade, elevada resolução e tempos de

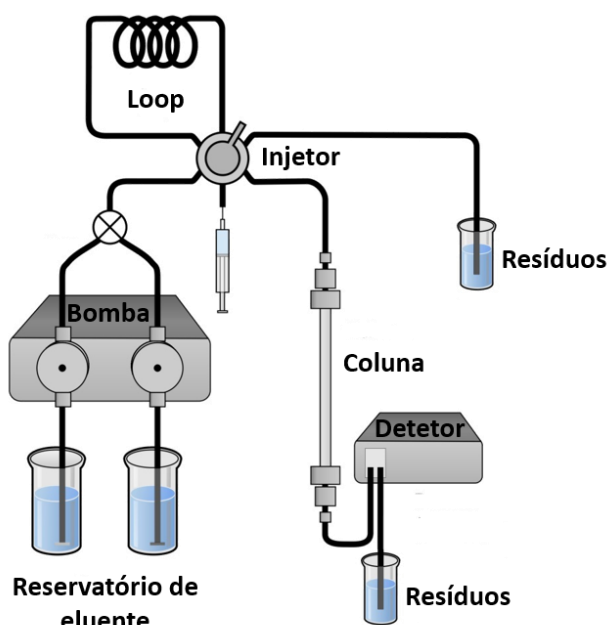


Figura 13: Esquema explicativo de um cromatógrafo líquido^[49]

análise que têm vindo a ser reduzidos com o uso generalizado das colunas do tipo “core-shell”. No entanto, é uma técnica de elevado custo de manutenção e de operação, que necessita de operadores com experiência no seu manuseamento. Atenção especial deve também ser dada à seleção dos eluentes utilizados pois, dependendo das suas propriedades, podem reagir com a fase estacionária, ou até mesmo com outros componentes do cromatógrafo, reduzindo irremediavelmente o seu tempo de vida.

Para além disso, é muito importante que todos os solventes usados na preparação dos eluentes tenham um elevado grau de pureza, sendo recomendado o nível de pureza “HPLC grade”, e sejam previamente filtrados por membranas de porosidade 0,2 - 0,45 μm e quimicamente compatíveis, isto não só para retirar partículas sólidas que possam danificar os pistões da bomba e entupir precocemente a pré-coluna, a coluna ou mesmo as diversas tubagens, mas também para prevenir contaminantes que possam interferir na separação cromatográfica ou até na quantificação. Por razões semelhantes, também as amostras devem ser filtradas por membranas de diâmetro de poro de 0,2 μm momentos antes de serem ensaiadas. Para além da filtração, as amostras são muitas vezes submetidas a outros tratamentos prévios devido à complexidade da matriz. Estes tratamentos servem não só para eliminar compostos que possam de alguma forma perturbar a separação cromatográfica, reduzindo o efeito da matriz da amostra, mas também para promover a eventual derivatização do analito.

Frequentemente, é usual proceder-se à diluição ou à concentração da solução resultante dos diversos tratamentos a que a amostra é sujeita para reduzir ou aumentar a concentração do(s) analito(s) de modo a assegurar a(s) respetiva(s) quantificação(ões) dentro da gama de trabalho definida pelas correspondentes retas de calibração.

Dentro da cromatografia líquida, existem vários tipos de cromatografia. Com base na natureza da fase estacionária, a cromatografia líquida é habitualmente subdividida em diferentes tipos:

- Cromatografia líquida de fase reversa
- Cromatografia líquida de fase normal
- Cromatografia iónica
- Cromatografia de exclusão molecular
- cromatografia de afinidade
- cromatografia quiral

De todos aqueles tipos de cromatografia apenas se irá fazer referência à cromatografia líquida de fase reversa por ter sido a técnica de separação usada no presente trabalho.

4.1. Bomba

Num cromatógrafo de HPLC, a bomba é o componente que permite fazer a bombagem do eluente desde o reservatório até ao detetor, imprimindo-lhe um fluxo estável ao longo da separação cromatográfica. Dependendo da sua constituição, a bomba pode ainda conter o módulo de purga do eluente, que permite remover os gases dissolvidos, e proceder à preparação autónoma do eluente por mistura de 2 até 4 solventes (ou soluções) nas proporções desejadas. Quando a bomba não possibilita a preparação do eluente por mistura de 2 ou mais solventes é designada por bomba isocrática. As restantes são classificadas de binárias, ternárias e quaternárias quando permitem misturar até 2, 3 e 4 solventes, respetivamente. Para além da comodidade que estas bombas oferecem na preparação do eluente, permitem ainda variar a composição do eluente ao longo da separação cromatográfica para melhor separar os analitos e permitir análises mais rápidas e eficientes. Assim, existem dois modos de eluição distintos em cromatografia líquida: isocrático e gradiente, que se encontram caracterizados na Tabela 12.

Tabela 12: Modos de eluição em cromatografia líquida

Modo de eluição	Características
Eluição isocrática	A composição da fase móvel mantém-se inalterável ao longo da separação cromatográfica.
Eluição gradiente	A composição da fase móvel varia ao longo da separação cromatográfica.

Um bom sistema de bombagem deve ter as seguintes características^[50]:

- O fluxo deve ser estável e isento de pulsações
- Deve permitir uma boa reprodutibilidade a fluxos baixos e elevados
- O volume deslocado deve ser constante
- A bomba deve suportar elevadas pressões (420 atm)
- Sempre que possível, deve ser adaptável ao trabalho em modo de eluição gradiente

De uma maneira geral, as três primeiras características acima referidas são asseguradas pelo uso de bombas concebidas com base no princípio do êmbolo recíproco de pistão duplo (Figura 14), que permite o bombeamento de um fluxo o mais livre de pulsações possíveis. A redução ou eliminação da pulsação tem um impacto positivo na análise cromatográfica por manter constante a velocidade do eluente e reduzir o ruído do sinal analítico, possibilitando a repetibilidade dos tempos de retenção e a obtenção de limites de deteção e de quantificação reduzidos.

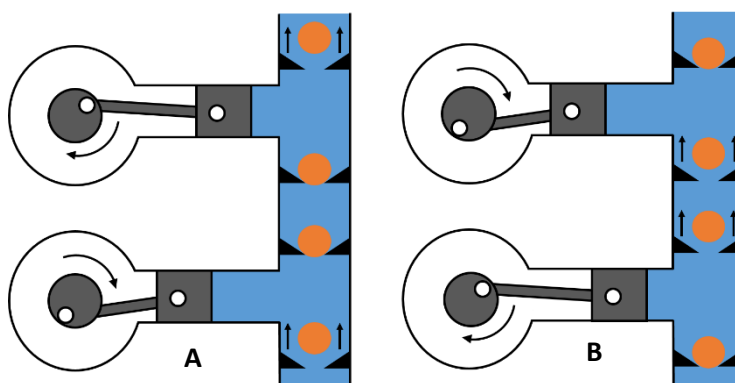


Figura 14: Esquema ilustrativo do funcionamento de uma bomba de êmbolo recíproco. A: Aspiração pelo êmbolo inferior. B: Aspiração pelo êmbolo superior.

4.2. Injetor

É através do injetor que se procede à introdução da porção de amostra a ensaiar na fase móvel. Processa-se mediante uma seringa que transfere parte da amostra para uma câmara (*loop*), onde posteriormente é arrastada pela fase móvel até à coluna de separação. Existem *loop*'s de volumes variados (10 μL ; 20 μL ; 50 μL ; etc) que podem ser utilizados parcialmente ou na sua totalidade. Embora várias vezes não se utilize o volume total, o uso da totalidade do volume do *loop* permite uma maior repetibilidade dos resultados experimentais. De uma maneira geral, o injetor deve exibir um comportamento repetível de modo a injetar, na fase móvel, os volumes de amostra com boa exatidão e precisão. Também, tanto a seringa como o *loop* devem ser constituídos por materiais quimicamente inertes e não devem contribuir para o alargamento dos picos cromatográficos.

O enchimento do *loop* é, então, feito com o auxílio de uma seringa e de uma válvula de duas vias: enchimento e injeção, cujo funcionamento está ilustrado na Figura 15.

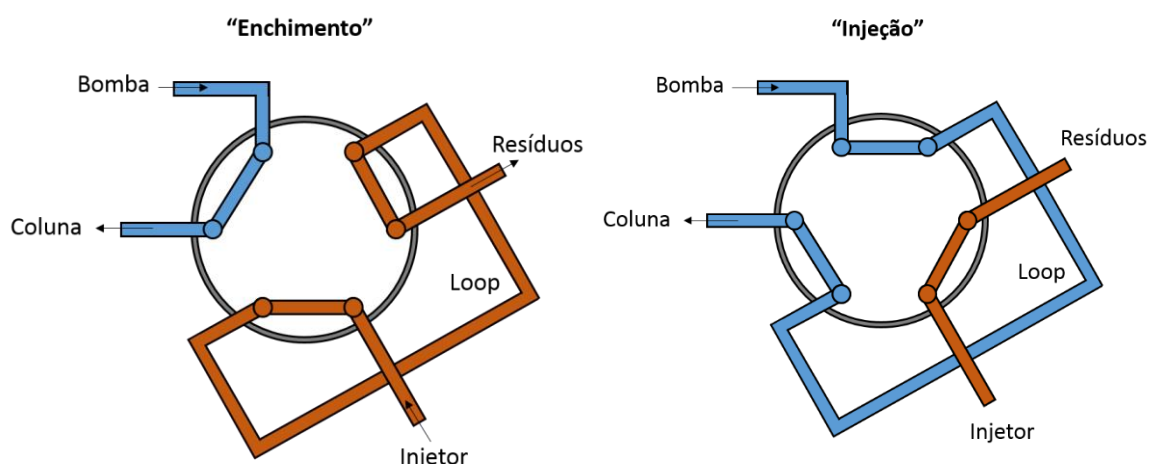


Figura 15: Esquema representativo do funcionamento do injetor constituído por uma válvula de 2 vias

É na posição de "enchimento" que se faz o preenchimento do *loop* com a amostra a ensaiar e na posição de "injeção" que se introduz o volume de amostra na fase móvel. De seguida a seringa e o *loop* são lavados com uma solução de limpeza apropriada e que muitas das vezes se identifica com o eluente usado na separação cromatográfica. Para evitar que permaneçam resíduos não injetados no injetor é preponderante que esta lavagem seja eficaz, caso isto não aconteça os resíduos são também injetados nos ensaios cromatográficos seguintes, comprometendo a análise (efeitos de memória do cromatógrafo).

4.3. Coluna

A coluna é um dos componentes mais importantes de um cromatógrafo líquido. É nela onde se processa a separação cromatográfica, sendo as suas propriedades muito importantes para que se observe a separação pretendida. É composta por um suporte cilíndrico de um material inerte (normalmente aço inoxidável), de dimensões bem definidas e com um material de enchimento no seu interior (fase estacionária). A fase estacionária é composta pelo material de enchimento (normalmente partículas porosas de sílica com forma esférica) que podem, ou não, estar recobertas por uma fase ligada. A separação dos constituintes da amostra ocorre mediante o grau de afinidade que tenham com a fase estacionária e a fase móvel (Figura 16), sendo que o aumento da afinidade para a fase estacionária provoca um aumento no tempo necessário à completa eluição dos analitos (tempo de retenção do analito).

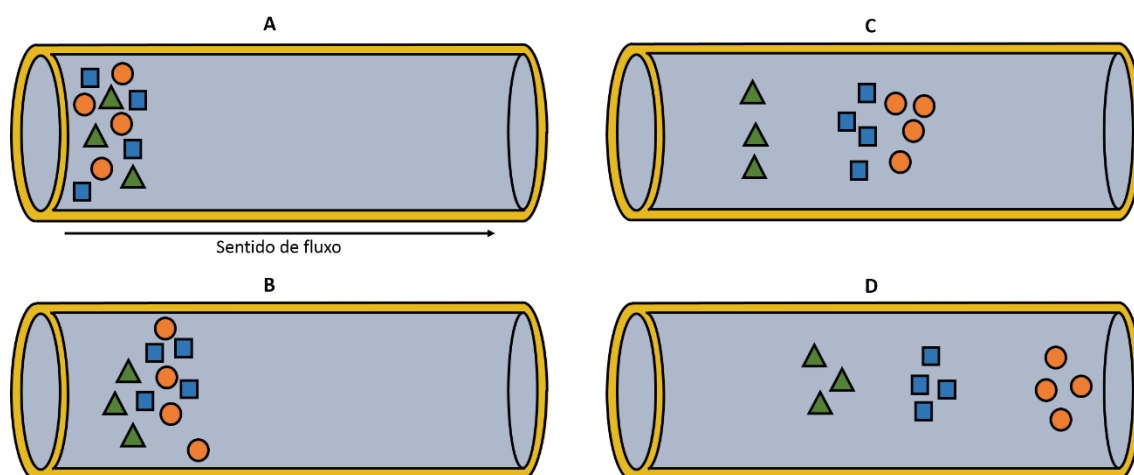


Figura 16: Esquema ilustrativo do processo de separação cromatográfica. A: Início da separação cromatográfica, B: Separação cromatográfica numa fase inicial, C: Separação cromatográfica com o primeiro composto distinguido, D: Etapa final da separação cromatográfica com todos os compostos separados

A resolução cromatográfica (grau de separação dos vários analitos é determinada por fatores mecânicos e químicos. Os fatores mecânicos, como por exemplo o comprimento da coluna, o tamanho de partícula e a uniformidade do empacotamento da fase estacionária na coluna, contribuem significativamente para a eficiência da coluna. Enquanto que os fatores químicos (competição físico-química dos compostos pela fase móvel e estacionária) contribuem fundamentalmente para a seletividade da separação.

a) Fatores mecânicos

É importante na escolha de uma coluna ter em consideração as suas propriedades físicas. Colunas de grandes dimensões e tamanhos de partículas (T_P) reduzidos possibilitam uma maior eficiência. No entanto, esse aumento de eficiência é conseguido à custa de um maior consumo de eluente, tempo de separação cromatográfica e aumento de pressão interna. A eficiência da separação cromatográfica é normalmente quantificada pelo número de pratos teóricos (N) através da seguinte expressão:

$$N = \frac{16 V^2}{W^2} \quad (1)$$

Em que (V) é medido em unidades de tempo e identifica-se com o tempo de retenção do pico cromatográfico, e (W) é a largura do pico, quando medido através do traçado de uma tangente à curva gaussiana nos seus pontos de inflexão e extrapolando até a interseção com a linha de base.

O número de pratos teóricos descreve a dispersão do pico cromatográfico em relação ao seu centro e pode ser utilizada como uma medida da eficiência da coluna. Esta aumenta com o comprimento da coluna e com a redução do tamanho de partícula da fase estacionária.

b) Fatores químicos

A seletividade, definida pelo grau de seletividade, também designado por fator de seletividade (α) ou fator de separação, permite avaliar a capacidade de um método distinguir o/os analito/s em interesse uns dos outros e de constituintes presentes nas amostras (Equação 2).

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} = \frac{t_{R(subs.1)} - t_{R(0)}}{t_{R(subs.2)} - t_{R(0)}} \quad (2)$$

Onde k_1 e k_2 representa o fator de retenção da substância 1 e 2, $t_{R(subs.1)}$ e $t_{R(subs.2)}$ representa o tempo de retenção da substância 1 e 2 e $t_{R(0)}$ o tempo de retenção de um composto sem afinidade para a fase estacionária (pode também ser representado pelo tempo de retenção do pico do sistema).

Este fator está diretamente ligado à afinidade dos compostos para a fase estacionária e varia com a fase móvel utilizada. Assim, alterando a fase móvel utilizada o fator de seletividade (α) sofre alterações. Quanto maior o grau de separação entre os

picos cromatográficos, mais seletiva é a técnica. Posto isto é possível proceder à separação dos analitos atuando sobre três tipos de propriedades distintas. Polaridade, carga e tamanho molecular. Visto no presente trabalho a separação dos compostos se proceder através da sua polaridade, não se irá descrever os outros modos de separação.

Neste tipo de cromatografia utilizam-se fases de polaridades diferentes que, dependendo da polaridade dos analitos, provocam uma maior ou menor retenção dos compostos, separando-os. Assim, dentro deste género de separação cromatográfica, é possível dois tipos de cromatografia líquida baseadas na polaridade da fase estacionária. Cromatografia líquida de fase normal e cromatografia líquida de fase reversa, cujas características fundamentais estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13: Diferenças fundamentais entre a separação cromatográfica de fase normal e fase reversa

Modo de separação	Fase estacionária	Fase móvel
Fase normal	Polar	Apolar
Fase reversa	Apolar	Polar

Para este tipo de cromatografia, existem vários exemplares de colunas cromatográficas que diferem, nas suas propriedades físico-químicas. Em particular, relativamente à fase ligada, esta é formada por grupos funcionais que estão ligados covalentemente às partículas (material de enchimento), conferindo-lhes as propriedades químicas desejadas (Figura 17). Normalmente a fase estacionária é formada por partículas de sílica, no entanto também podem ser utilizados polímeros na sua composição. Para além da polaridade das fases móvel e estacionária, existem outros

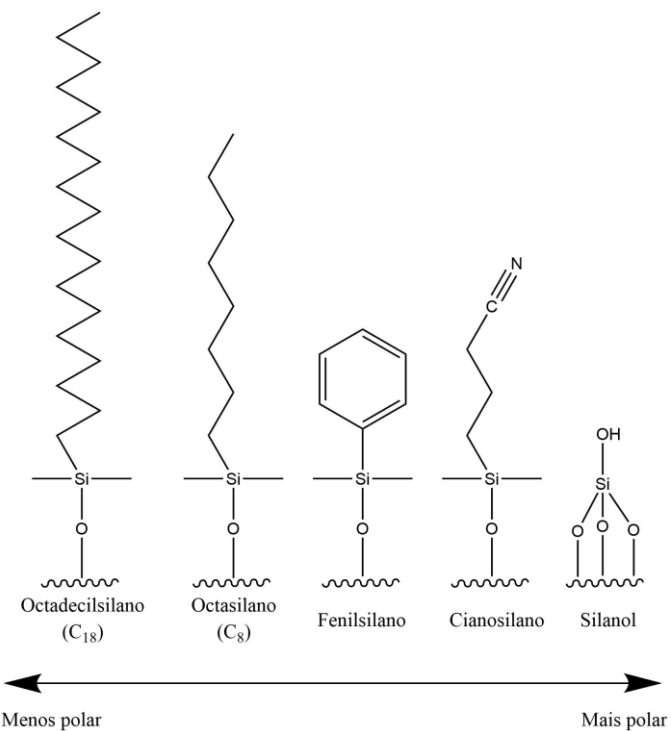


Figura 17: Fases ligadas mais utilizadas em cromatografia líquida, preparadas a partir da substituição do grupo silanol

fatores importantes na separação cromatográfica, tais como a temperatura da coluna, o fluxo e pH da fase móvel, e o modo de eluição.

4.4. Detetor

Existem vários detetores que podem ser hifenados com a cromatografia líquida.

Desde detetores de condutividade elétrica e eletroquímicos, que medem respetivamente a condutividade elétrica dos eluatos e a diferença de potencial ou a intensidade de corrente elétrica gerada por dois elétrodos mergulhados no eluato; detetores de índice de refração, que detetam diferenças no índice de refração do eluato ao longo da separação; até detetores espectrofotométricos, como por exemplo o de fluorescência e o de ultravioleta-visível (UV-Vis) nas suas diferentes versões de

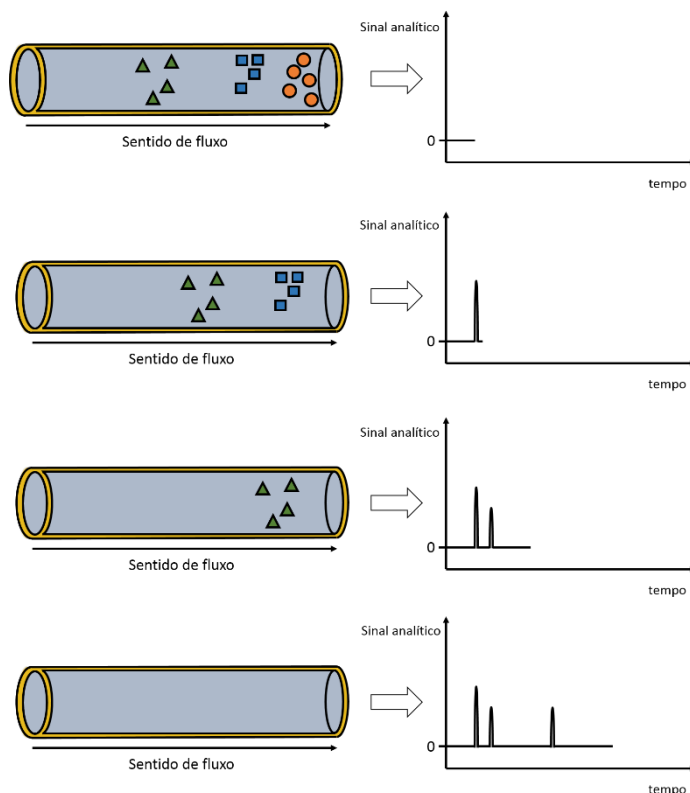


Figura 18: Evolução de uma separação cromatográfica acompanhada por um detetor

comprimento de onda fixo, variável ou de rede de díodos (*"diode-array"*), que medem respetivamente a quantidade de radiação emitida pelo eluato após prévia excitação e a quantidade de radiação absorvida pelo eluato em consequência da radiação que sobre ele se faz incidir ^[51, 52]. No final e para qualquer um dos detetores, o sinal medido é então representado em função do tempo de separação, dando origem a uma representação gráfica designada por cromatograma (Figura 18).

A seleção do detetor está fortemente condicionada pelas características químicas ou físicas das espécies a detetar. No entanto, a escolha do detetor também deverá atender a outras características, nomeadamente possuir baixo limite de deteção, elevada sensibilidade, seletividade e linearidade, pouco sensível às variações de temperatura e fluxo e níveis elevados de precisão e exatidão.

De forma a não contribuir para o alargamento dos picos cromatográficos, nem para o aumento do seu grau de assimetria, o detetor deve ser rápido a gerar o sinal

analítico e possuir uma célula com um volume de análise não superior a 20% do volume correspondente ao pico cromatográfico.^[53]

4.4.1. Detetor UV-VIS

O detetor UV-VIS é um detetor bastante utilizado em cromatografia líquida devido fundamentalmente ao elevado número de espécies químicas que absorve radiação na região UV e ao facto de ter um baixo custo, tolerar a eluição em modo gradiente e não ser fortemente afetado por pequenas variações de temperatura e de fluxo da fase móvel. Como já foi referido, o seu funcionamento baseia-se na absorção de radiação pelas espécies químicas, em condições de comprimento de onda fixo ou variável, na região UV-Vis. Para tal, é feita incidir uma radiação de comprimento de onda (λ) bem definido numa célula espectralométrica de dimensões reduzidas e para onde é encaminhado o eluato depois de sair da coluna cromatográfica. É perante a diferença entre a intensidade da radiação incidente ($I_{ins.}$) e a intensidade da radiação transmitida através da célula espectralométrica ($I_{trans.}$) que é possível conhecer a quantidade de radiação absorvida pelo eluato ao longo da separação (Figura 19). Assim, após conversão e amplificação do sinal analítico, é possível fazer a aquisição deste sinal com o decorrer do tempo de separação cromatográfica, obtendo-se desse modo o correspondente cromatograma.

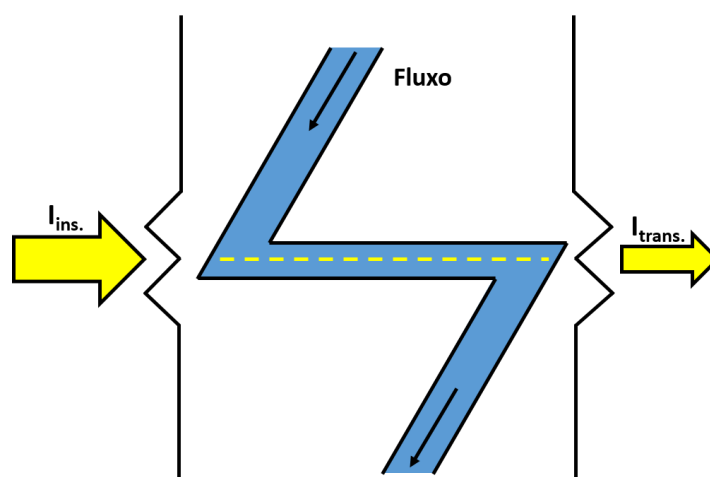


Figura 19: Processo de medição do sinal analítico

A relação entre a fração de radiação absorvida (absorvância) e a concentração dos analitos é feita perante a lei de *Lambert-Beer*^[51].

$$A = \log_{10} \frac{I_{ins.}}{I_{trans.}} = \epsilon \times l \times C_{analito}$$

Em que A é a absorvância; $I_{\text{ins.}}$ é a intensidade da radiação incidente; $I_{\text{trans.}}$ é a intensidade da radiação transmitida; ϵ é a absortividade do analito; l é o comprimento do trajeto ótico no interior da célula e C_{analito} é a concentração do analito na amostra ensaiada.

De uma maneira geral, os detetores UV-Vis são compostos por uma única lâmpada de xenon ou por duas lâmpadas (tungsténio e deutério) que permitem a utilização de uma larga gama de comprimentos de onda (190 nm a 800 nm), um monocromador constituído por duas fendas (a de entrada e a de saída da radiação) e por um elemento difrativo da luz (prisma ou rede de difração) que decompõe a radiação policromática emitida pela fonte de radiação em feixes de radiação monocromática com os comprimentos de onda pretendidos à medição analítica. A radiação monocromática selecionada pelo monocromador é dirigida para a célula espectrofotométrica^[51], sendo a radiação transmitida encaminhada para o fotodetector, constituído por um material fotosensível, onde a sua intensidade é quantificada e posteriormente armazenada na unidade de processamento de dados do detetor sob a forma de um sinal elétrico. Tendo em atenção a intensidade da radiação incidente ou qualquer outra intensidade tomada como referência, o sinal elétrico referente à intensidade de radiação transmitida é convertido em unidades de absorvância (mAU)^[50] (Figura 20).

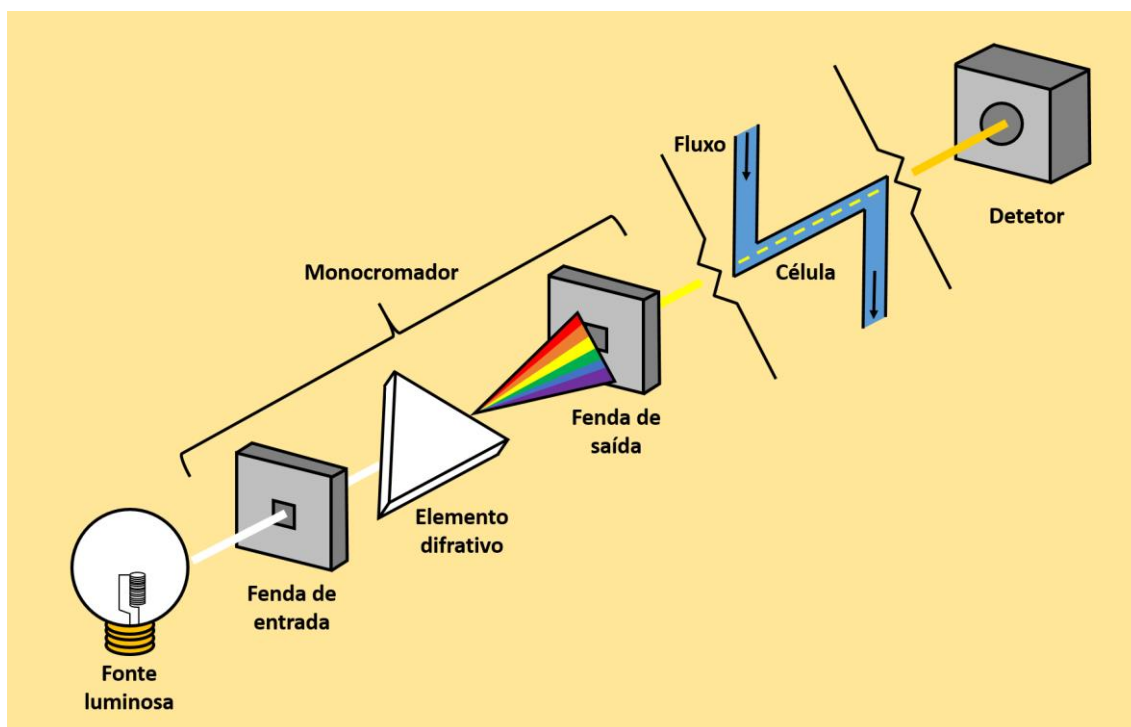


Figura 20: Principais componentes de um detetor UV-VIS

Frequentemente, o comprimento de onda é escolhido tendo em conta o comprimento de onda onde a absorção de radiação por parte do analito é máxima (λ_{\max}). Da mesma forma é usual a utilização de comprimentos de onda onde a fase móvel e possíveis interferentes não absorvam. Esta versatilidade dos detetores UV-VIS apresentarem sensibilidades diferentes para analitos e eluente, quando sujeitos à mesma radiação monocromática, é, por si só, uma grande vantagem relativamente a outros detetores, pelo simples facto da quantificação dos analitos poder ser feita sem influência apreciável da matriz do eluente. Outras vantagens deste detetor encontram-se referidas na Tabela 14.

Tabela 14: Vantagens e desvantagens do detetor UV-VIS^[51, 54]

Vantagens	Desvantagens
Elevada sensibilidade, em particular na região UV	Aplicável a compostos que absorvam radiação entre 190nm e 800 nm
Boa seletividade, em particular entre analitos e eluente	Sensível a impurezas
Boa estabilidade e reprodutibilidade	
Baixo ruído	
Limites analíticos baixos	
Baixo custo de aquisição e manutenção	
Deteção não destrutiva	
Compatível com eluições em modo gradiente	

Os analitos que não absorvam radiação na região UV-Vis não podem ser detetados diretamente pelos detetores UV-Vis. Para que a deteção possa acontecer é necessário recorrer à sua prévia derivatização. Este procedimento não é exclusivo da deteção UV-Vis, podendo ser usado para qualquer outro tipo de deteção que evidencie insensibilidade ao analito e desde que se conheça a correspondente reação de derivatização. As reações de derivatização são então caracterizadas pela transformação do analito, por ação de um agente derivatizante, num produto que passe a ser ativo ao detetor selecionado para proceder à deteção e quantificação do analito. Particularizando, a análise de FA por HPLC é feita após a sua derivatização por ação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) ou da pentanodiona^[55-57] (Figura 21).

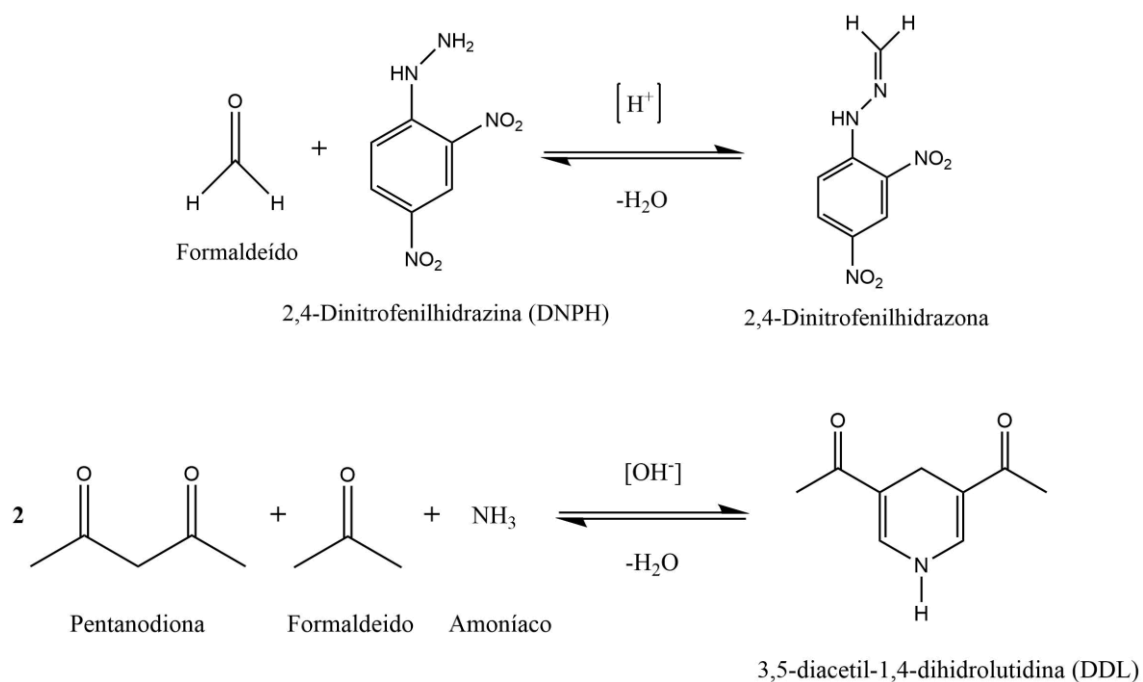


Figura 21: Equações químicas representativas da reação de derivatização de formaldeído com DNPH e pentanodiona ^[52-54]

Para além de permitir adequar os analitos à sua análise, o uso de reagentes derivatizantes provoca, por vezes, o aumento da seletividade e da sensibilidade da técnica de deteção.

5 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico consiste numa avaliação sistemática do seu procedimento com o intuito de demonstrar que está a ser executado sob as condições em que deve ser aplicado. O modo mais simples de o fazer baseia-se na confirmação experimental de que o método de análise possui um conjunto de requisitos necessários para que se lhe reconheça competência, credibilidade e desempenho consistente com o que se ambiciona obter através da sua aplicação. Esses requisitos identificam-se com os parâmetros de mérito habitualmente usados para assegurar a fiabilidade de um método analítico e que são: precisão, exatidão, seletividade, sensibilidade, limites analíticos, linearidade e robustez (Tabela 15).

Tabela 15: Parâmetros de mérito de um método analítico

Parâmetros de mérito	Objetivo
Precisão	Medir a dispersão de uma série de resultados obtidos a partir do tratamento de uma mesma amostra homogénea.
Exatidão	Medir o desvio do valor experimental ao valor de referência.
Seletividade	Conhecer a capacidade de o método detetar e quantificar inequivocamente o analito na presença de impurezas.
Sensibilidade	Avaliar a diferença mínima entre duas concentrações próximas possíveis de serem distinguidas.
Limites analíticos	Conhecer os valores abaixo dos quais o método analítico não tem capacidade de quantificar e/ou detetar uma substância.
Linearidade	Avaliar a relação entre os pontos experimentais.

5.1. Precisão

A precisão de um método analítico é definida como sendo o grau de concordância entre os valores de um conjunto de ensaios de uma mesma amostra por si executados em condições experimentais controláveis. É quantificada pelo desvio-padrão, variância ou pelo coeficiente de variação, também designado por desvio-padrão relativo, que exprimem uma medida da dispersão referente à distribuição dos valores analíticos em torno da sua média.

A precisão pode ser quantificada para três diferentes níveis de incerteza: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

5.2. Repetibilidade

A repetibilidade é um parâmetro que permite avaliar a dispersão do método analítico quando executado nas mesmas condições de preparação, extração, separação e análise. A quantificação da repetibilidade do método serve como critério de aceitação para ensaios em condições de repetibilidade servindo como termo de comparação entre métodos analíticos.

Uma das formas recomendadas para o cálculo da repetibilidade obriga a realização de um mínimo de 10 ensaios, em condições de repetibilidade, relativos às concentrações extremas da reta de calibração e/ou 10 tomas da mesma amostra. A partir destes valores é calculada a média, desvio padrão, variância, coeficiente de variação (CV_r) e intervalo de confiança relativo à repetibilidade. O valor de repetibilidade foi calculado a partir da equação 3

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_r^2} \quad (3)$$

Com a finalidade de se introduzir um critério de aceitação da repetibilidade do método analítico recorreu-se à equação de *Horwitz*, fazendo a comparação entre os valores previstos por esta relação e os obtidos experimentalmente. Como tal, sabendo que o coeficiente de variação da repetibilidade se identifica com dois terços do valor previsto pela equação de *Horwitz*^[58], utilizou-se a equação de *Horwitz* modificada (equação 4) para o cálculo de CV^* .

$$CV^* = 2^{(1-0,5 \log C)} \times 0,67 \quad (4)$$

O valor obtido é então usado como majorante do critério de aceitação dos valores de CV_r obtidos em condições de repetibilidade, desde que não exceda o valor de 10% para os métodos analíticos desenvolvidos no presente trabalho. Caso exceda, o critério de aceitação da repetibilidade é fixado em 10%.

5.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia é um parâmetro que permite avaliar a dispersão do método analítico em condições de execução intra-laboratorial, onde obrigatoriamente se varia pelo menos uma condição de ensaio, como por exemplo o momento em que o ensaio é realizado, o analista e o instrumento de análise. No presente trabalho, a precisão intermédia foi avaliada somente à custa da variação do momento da realização do ensaio analítico, mantendo-se constantes as restantes condições experimentais. Nestas condições de ensaio, a incerteza da precisão intermédia encontra-se muito próxima da incerteza da repetibilidade, podendo, por vezes, não ser possível de as distinguir estatisticamente. Por esta razão e dado que o Laboratório tem necessidade que os métodos analíticos sejam executados com uma precisão próxima da repetibilidade, estabeleceu-se através de um requisito interno imposto pelo laboratório que a precisão intermédia, avaliada nas condições referidas, não deveria exceder uma incerteza de 10%.

Como forma de estimar experimentalmente a precisão intermédia do método analítico quando executado em condições muito próximas das usadas nos ensaios das diferentes amostras, procedeu-se ao ensaio, com repetição de duas vezes, de uma solução padrão ao longo de quatro dias consecutivos.

5.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é o parâmetro que permite avaliar a proximidade dos resultados obtidos aos valores verdadeiros ou de referência. É habitualmente avaliada a partir de ensaios com amostras de referência, de ensaios de recuperação e/ou da comparação de resultados provenientes de dois ou mais métodos de análise, em que um deles assume o papel de método de referência.

No presente trabalho, a exatidão foi avaliada através da comparação com amostras de referência, e de ensaios de recuperação (equação 5).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{[\text{Analito}]_{Am.Dop.} - [\text{Analito}]_{Am.}}{[\text{Analito}]_{Ad.}} \times 100 \quad (5)$$

Em que $[\text{Analito}]_{Am.Dop.}$ é a concentração de analito na amostra dopada com uma adição externa de analito, $[\text{Analito}]_{Am.}$ é a concentração de analito na amostra não dopada e $[\text{Analito}]_{Ad.}$ é a concentração de analito correspondente à dopagem da amostra.

Na ausência de erro sistemático, a percentagem de recuperação esperada será de 100% sob a qual incide uma dispersão definida pelo laboratório. Neste trabalho foi utilizado um intervalo de aceitação compreendido entre 90 e 110% ou, de uma forma mais permissiva, 80-120%.

5.5. Seletividade

A seletividade serve para avaliar a capacidade de um método em distinguir os analitos entre si ou de outros constituintes presentes nas amostras. Visto o método recorrer a uma técnica de separação hifenada com detetor (UV-Vis), a sua seletividade é composta pelas seletividades da técnica de separação e do detetor. Quando o detetor utilizado apresenta reduzida seletividade, como é o caso do detetor UV-Vis, a seletividade do método analítico é praticamente expressa pela seletividade da técnica de separação. Assim, a seletividade dos métodos desenvolvidos é quantificada através do fator de seletividade (α), também denominado como fator de separação (Equação 6).

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (6)$$

Em que k_1 e k_2 representa o fator de retenção da substância 1 e 2 respetivamente.

O fator de retenção é o parâmetro que permite avaliar o tempo que os componentes da amostra residem na fase estacionária, relacionando-o com o tempo que estes residem na fase móvel. Este termo exprime o tempo que o analito é retardado pela fase estacionária. (Equação 7)

$$k = \frac{t_{R(subs.)} - t_{R(0)}}{t_{R(0)}} \quad (7)$$

Onde $t_{R(subs.)}$ é o tempo de retenção do analito e $t_{R(0)}$ é o tempo morto.

O parâmetro de seletividade como não entra em consideração com a largura do pico, faz com que seja necessário atender à resolução (R) para se avaliar corretamente a seletividade do método desenvolvido (Equação 8).

$$R = \frac{t_{R(subs.1)} - t_{R(subs.2)}}{\left(\frac{W_1 + W_2}{2}\right)} \quad (8)$$

Em que $t_{R(subs.1)}$ e $t_{R(subs.2)}$ representam o tempo de retenção da substância 1 e 2, enquanto W_1 e W_2 representam a largura dos picos 1 e 2, respetivamente.

É importante obter fatores de seletividade ligeiramente acima de 1 e valores de resolução iguais ou superiores a 1,5, pois indica uma separação de picos cromatográficos com uma área de sobreposição nunca superior a 0,2%. [59, 60]

5.6. Sensibilidade

Sensibilidade divide-se em sensibilidade da técnica instrumental (S_T) e sensibilidade do método analítico (S_M). S_T é a taxa de variação da propriedade física medida pela técnica instrumental com a concentração do analito e identifica-se com o declive da reta de calibração (m). Já S_M identifica-se habitualmente com o inverso do desvio padrão da concentração do analito que é interpolada (S_C) através da reta de calibração. Este parâmetro permite uma comparação expedita da sensibilidade entre dois ou mais métodos analíticos. No entanto o seu significado não é de fácil compreensão (Equação 9).

$$S_M = \frac{m}{s_s} = \frac{s_s/s_c}{s_s} = \frac{1}{s_c} \quad (9)$$

Em que S_s é o desvio padrão do sinal analítico.

Em sua substituição utiliza-se muitas vezes a diferença mínima significativa entre concentrações, ΔC , de um mesmo analito, que o método pode discriminar com um certo grau de confiança.

Assim essa diferença mínima, para situações de homogeneidade de variâncias é obtida, para um grau de confiança de 99%, através da expressão:

$$3 \times \sqrt{2} \times S_C$$

Em que $\sqrt{2} \times S_C$ identifica-se com o desvio padrão referente à diferença entre concentrações similares.

5.7. Limites analíticos

De acordo com a IUPAC, os limites analíticos dividem-se em limites de deteção e quantificação (LOD e LOQ). O limite de deteção do método analítico, de acordo com esta organização, identifica-se com o início da gama onde, com uma probabilidade declarada, o sinal da amostra pode ser distinguido do respetivo branco (Equação 10).

$$LOD_M = \frac{3,3s_b}{m} \quad (10)$$

Onde s_b é o desvio padrão do sinal do branco (desvio padrão da linha de base) e m é o declive relativo à reta de calibração.

Simultaneamente a IUPAC define o limite de quantificação como sendo o início do intervalo em que o coeficiente de variação do sinal analítico se reduziu a valores (10%) tais que, com um certo grau de confiança, se poder efetuar uma determinação quantitativa (Equação 11).

$$LOQ_M = \frac{10s_b}{m} \quad (11)$$

Quando não se conhece o desvio padrão da linha de base, é possível estimar estes limites através da aplicação de algumas aproximações simplificativas. Nomeadamente a determinação dos limites analíticos através do desvio padrão residual da reta de calibração ($s_{y/x}$). Ou através do ensaio de um conjunto de brancos fortificados, independentes, testados em condições de precisão intermédia, e sobre os quais serão feitos estudos de exatidão e precisão (erro relativo em relação ao branco fortificado e coeficiente de variação, respetivamente).

No entanto estas aproximações, como é o caso da primeira, conduzem, por vezes, a valores por excesso dos limites analíticos. De forma a evitar a sempre indesejável sobre-estimativa, os limites analíticos foram obtidos através da razão sinal ruído ($\frac{S}{N}$) da menor concentração da reta de calibração. Visto que a razão entre as concentrações do analito e do limite de deteção/quantificação estar relacionada com a razão entre as respetivas razões sinal-ruído, é possível calcular os limites de deteção e quantificação do método pelas equações 12 e 13.

$$\frac{[Analito]}{LOD_M} = \frac{S/R_{[Analito]}}{S/R_{LOD}} \quad (12)$$

$$\frac{[Analito]}{LOQ_M} = \frac{S/R_{[Analito]}}{S/R_{LOQ}} \quad (13)$$

Em que $S/R_{[Analito]}$ é a razão sinal-ruído relativa ao sinal do analito, e S/R_{LOD} e S/R_{LOQ} é a razão sinal-ruído que se identifica com o limite de deteção e quantificação, respetivamente.

5.8. Linearidade

A linearidade de um método analítico mede a capacidade do método em gerar um sinal analítico que seja diretamente proporcional à concentração do analito, ou a qualquer outro termo relacionado com aquela concentração, de modo a ser descrito por uma função analítica linear dentro de uma dada gama de concentrações. A análise de correlação linear é o procedimento mais simples de avaliação da linearidade da função analítica, onde o coeficiente de correlação (r^2) traduz a adequabilidade da aplicação do modelo linear aos pontos experimentais. Outros procedimentos são também usados para avaliar a linearidade, como por exemplo o teste de análise de resíduos e teste de *Mandel*.

O teste de *Mandel* e o critério do coeficiente de correlação ($r^2 > 0,995$) foram os dois procedimentos usados na avaliação da linearidade dos métodos de ensaio desenvolvidos no presente trabalho. O teste de *Mandel* inicia-se com a avaliação da homogeneidade de variâncias dentro da gama de concentrações da curva de calibração.

Assim, a partir de no mínimo dez ensaios realizados, em condições de repetibilidade, sobre as soluções padrão de menor e maior concentração da gama de trabalho, calcularam-se os respetivos desvios padrão. A partir das variâncias encontradas, calculou-se o valor de teste F (F_{exp}) (equação 14), e procedeu-se à sua comparação com o respetivo valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher (F_{tab}), para um grau de significância de 0,05 e atendendo aos graus de liberdade (g.l.) das variâncias referentes à concentração inferior e superior da gama de trabalho.

$$F_{exp} = \frac{S_{padrão1}^2}{S_{padrão2}^2} \quad (14)$$

- Se $F_{exp} < F_{tab}$ conclui-se que a diferença entre as variâncias não é significativa para o grau de significância considerado;
- Se $F_{exp} \geq F_{tab}$ conclui-se que a diferença entre as variâncias é significativa, para o grau de significância considerado, e a gama de trabalho deve ser reduzida até que se verifique homogeneidade das variâncias.

Após a conclusão desta etapa inicial, o teste de Mandel prossegue com a avaliação da linearidade da função analítica pela comparação estatística dos desvios padrão residuais da regressão de primeiro e segundo grau ($S_{Y\bar{X}}$ e S_{Y^2}).

Assim, através do desvio padrão residual de ambos os ajustes, ($S_{\bar{Y}}$ e S_{Y^2} respetivamente) foi possível calcular a diferença entre os respetivos somatórios dos quadrados dos desvios dos pontos experimentais às funções obtidas por ambos os (DS^2) através da equação 15.

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{\bar{Y}/X}^2 - (N - 3) \times S_{Y^2}^2 \quad (15)$$

Em que N é o número total de pontos experimentais usados nos ajustes de primeira e segunda ordem.

Assim, o valor de teste (PG) foi calculado dividindo o valor de DS^2 pela variância residual da regressão polinomial (Equação 16).

$$PG = DS^2 / S_{Y^2}^2 \quad (16)$$

Por fim, comparou-se o valor de teste com o valor tabelado da distribuição F (F_{tab}) para um grau de significância de 0,05 e os respetivos g.l.

- I. Se $PG \leq F_{\text{tab}}$ conclui-se que a função de calibração é, para um grau de significância de 0,05, ajustada adequadamente por uma função linear de grau 1.
- II. Se $PG > F_{\text{tab}}$, a função de calibração linear não conduz ao melhor ajuste dos pontos experimentais para o grau de significância considerado. A gama de concentrações deve ser reduzida ou então a linearidade deverá ser reavaliada por outro teste. Em alternativa, mesmo não sendo, por vezes, recomendável, poder-se-á aplicar uma função de calibração não linear.

6 Execução experimental

6.1. Reagentes, amostras, material e equipamento

Para evitar a presença de impurezas que possam eventualmente interferir no desempenho da separação cromatográfica, é necessário que todos os reagentes envolvidos na preparação das amostras, bem como os solventes utilizados na preparação do eluente sejam apropriados para HPLC. A água utilizada foi submetida a tratamento prévio constituído por um leito misto de resinas permutadores e uma unidade de carvão ativado, tendo uma resistividade de 13 MΩ.cm no momento da recolha. Os reagentes utilizados no decorrer do presente trabalho encontram-se referidos na Tabela 16, bem como o seu grau de pureza.

Tabela 16: Tabela de reagentes utilizados

Grau de pureza	
Acetonitrilo	
Metanol	HPLC Grade
Ácido acético	
Ácido sulfúrico	95-98%
Ácido clorídrico	AnalaR, solução aquosa a 37%
Dinitrofenilhidrazina	≥99,0%
Biocida A	Solução aquosa a 37%
Biocida B	99,9%
Biocida C	99,9%
Biocida D	99,7%
Biocida E	98,8%
Biocida F	95,2%
Biocida G	99,7%

Por questões de confidencialidade, as amostras ensaiadas não estão identificadas neste relatório. Foram submetidas a ensaio um total de 33 amostras distribuídas entre produtos acabados e matérias-primas. Todas as amostras foram sujeitas a tratamento prévio para as adequar ao ensaio cromatográfico, cujo procedimento está resumidamente referido na secção 2 do presente capítulo.

A execução do procedimento experimental exigiu a manipulação de uma série de equipamentos e materiais, que se encontram abaixo discriminados com omissão da marca e modelo.

- I. Ultrassons, para a homogeneização e desgaseificação de soluções e amostras;
- II. Centrifugadora para separação de fases;
- III. Balança analítica de precisão $\pm 0,0001\text{g}$;
- IV. Filtros de seringas com membrana de nylon de porosidade $0,2\ \mu\text{m}$;
- V. Seringas de 5 mL;
- VI. Vials 1,5 mL;
- VII. Micropipetas de capacidade 5 - $50\mu\text{L}$; 100 - $1000\mu\text{L}$ e 0,5 - 5mL;
- VIII. Cromatografo HPLC com detetor UV/Vis e coluna de separação C18 ($5\mu\text{m}$; 150mm x 4mm).

6.2. Procedimento experimental

Devido a este trabalho ter sido desenvolvido sob condições de confidencialidade, o procedimento experimental abaixo referido terá partes simplificadas e por vezes omissas.

Após uma extensa pesquisa bibliográfica foram escolhidos seis métodos de análise de biocidas com referência obrigatória ao tratamento das amostras e consequentemente à separação por HPLC e deteção/quantificação por UV/Vis. Os métodos de ensaio são identificados de 1 a 6 e foram aplicados a sete biocidas identificados de A a G. Em todos os métodos se prevê que as soluções stock sejam preparadas por pesagem rigorosa das respetivas substâncias, seguida da sua dissolução num solvente apropriado. As soluções padrão foram preparadas por diluição rigorosa das soluções stock previamente preparadas, sendo as suas concentrações calculadas tendo em conta as massas pesadas, pureza das substâncias, densidades e volumes utilizados. Em cada método analítico, a preparação das amostras e padrões foi realizada nos mesmos solventes.

No final, todas as soluções foram armazenadas ao abrigo da luz. As amostras e soluções preparadas utilizando os métodos 4, 5 e 6 foram também armazenadas a temperatura reduzida.

Os métodos analíticos desenvolvidos diferem entre si no método de tratamento das amostras e nas condições de separação e deteção. No desenvolvimento dos métodos de tratamento das amostras, recorreu-se isoladamente ou em conjunto a

técnicas de separação física nomeadamente a centrifugação e filtração que por vezes foram acompanhadas por tratamento térmico e evaporação de solvente.

6.3. Métodos de separação e análise por HPLC-UV/Vis

À semelhança do que foi referido no procedimento experimental, os métodos de separação e análise por HPLC também não poderão ser descritos detalhadamente por motivos de confidencialidade. Os seis métodos desenvolvidos variam entre si no tipo de eluição, nos solventes utilizados (frequentemente acetonitrilo, água e água acidulada), fluxo da fase móvel ($1-1,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), volume de injeção ($5-20 \mu\text{L}$), temperatura da coluna ($25-35 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e no comprimento de onda utilizado na análise. Os comprimentos de onda foram escolhidos de acordo com a substância a quantificar sendo normalmente escolhido o comprimento de onda correspondente à absorção máxima de radiação por parte do biocida.

7 Resultados

Depois de selecionados, os procedimentos dos seis métodos de análise foram inicialmente implementados e posteriormente desenvolvidos com vista à determinação de biocidas por HPLC. Após a implementação dos métodos observaram-se problemas em alguns deles, pelo que foi necessário introduzir algumas alterações aos procedimentos experimentais desses mesmos métodos. No caso do biocida F, encontraram-se problemas na sua separação cromatográfica. Face a esta realidade, estudou-se a melhor forma de se conseguir a sua separação e quantificação. Para validar os resultados obtidos experimentalmente procederam-se a ensaios de recuperação sobre várias amostras.

Durante a implementação dos métodos foram analisadas amostras de matérias primas e produtos acabados. Em alguns casos, devido aos teores dos analitos serem conhecidos, avaliou-se diretamente a exatidão dos métodos através da comparação entre a concentração obtida experimentalmente e a esperada.

Todos os teores de biocidas foram quantificados através do método da curva de calibração. A gama de trabalho foi escolhida mediante os teores esperados dos biocidas nas amostras. Após a implementação dos métodos e o reconhecimento da capacidade de cada um deles para proceder à separação e quantificação dos biocidas, deu-se início à validação pela execução de testes sobre a linearidade, recuperação, repetibilidade e precisão intermédia, limites de deteção, sensibilidade e seletividade.

7.1. Validação do método 1

7.1.1. Linearidade

Como mencionado no capítulo 5 de forma a avaliar a linearidade das retas de calibração, primeiro estudou-se a homogeneidade das variâncias ao longo da gama de trabalho pela equação 14. Como ponto de partida, avaliou-se a gama de concentrações de biocida A (Figura 22) entre 1 e 40 ppm. No entanto, devido a não haver homogeneidade de variâncias naquele intervalo de concentrações, houve necessidade de desdobrar a gama anterior em dois intervalos de concentração (1 – 5 ppm e 20 – 40 ppm) que viriam a ser usados no traçado de duas retas de calibração independentes (Tabela 17).

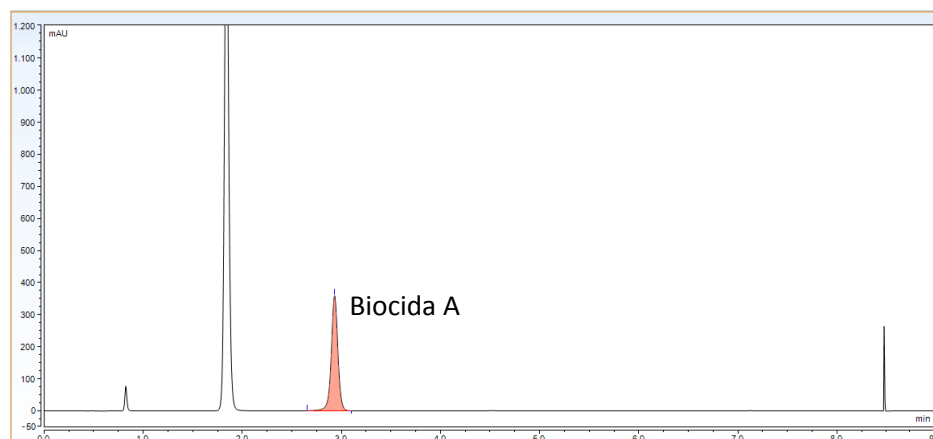


Figura 22: Cromatograma de uma amostra ensaiada contendo o biocida A

Tabela 17: Resultados da análise da homogeneidade de variâncias (1 – 5 e 20 – 40 ppm)

	Solução padrão 1,01 ppm	Solução padrão 5,04 ppm	Solução padrão 19,8 ppm	Solução padrão 40,6 ppm
	1,01	5,03	19,0	38,9
	1,01	4,98	19,9	40,0
	1,10	5,12	20,8	41,6
	0,99	5,03	20,8	38,6
	1,10	5,19	20,8	38,7
	1,03	4,98	19,7	38,8
	0,99	5,06	19,4	41,8
	1,02	5,10	19,5	41,5
	1,15	5,15	20,5	41,7
	1,01	5,25	18,6	41,9
Média	1,04	5,09	19,8	40,4
Desvio padrão	5,5x10 ⁻²	8,9x10 ⁻²	9,1x10 ⁻¹	1,5
Variância	3,1x10 ⁻³	7,9x10 ⁻³	8,3x10 ⁻¹	2,2
F _{exp.}	2,6		2,6	
F _{crit.(0,05;9;9)}			3,17	
Conformidade	Sim			

A partir do estudo de homogeneidade de variâncias foi possível concluir que, como o valor de $F_{exp.}$ se mostra inferior ao valor de $F_{crit.(0,05;9;9)}$ nas duas gamas de concentração estudadas, as variâncias atribuídas às concentrações entre 1-5 ppm são estatisticamente iguais. O mesmo ocorre para a segunda gama de concentrações, o que leva a admitir que as gamas de concentração estão bem ajustadas. Conclui-se que para a determinação de biocida A será mais indicado o uso de duas retas de calibração, uma para gamas altas e outra para gamas baixas.

O estudo da linearidade referente às retas de calibração de ambas as gamas de concentração foi realizado pelo método de *Mandel*, que se baseia na comparação das variâncias dos desvios padrão residuais relativos aos ajustes lineares de primeiro e segundo grau (Equação 16). Estes ajustes estão representados nas figuras 23 a 26 e os resultados apresentados na Tabela 18.

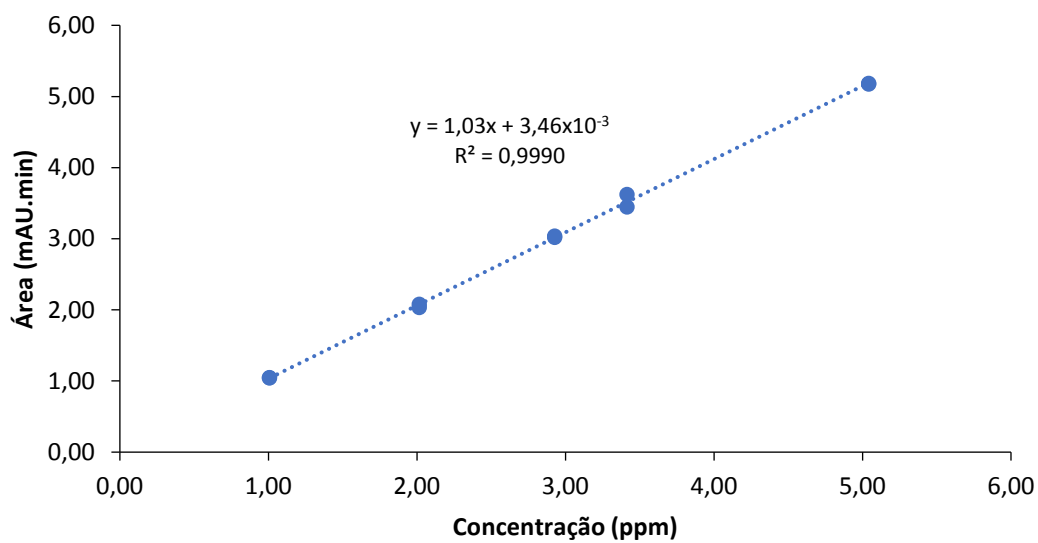


Figura 23: Regressão linear de primeiro grau (1-5 ppm)

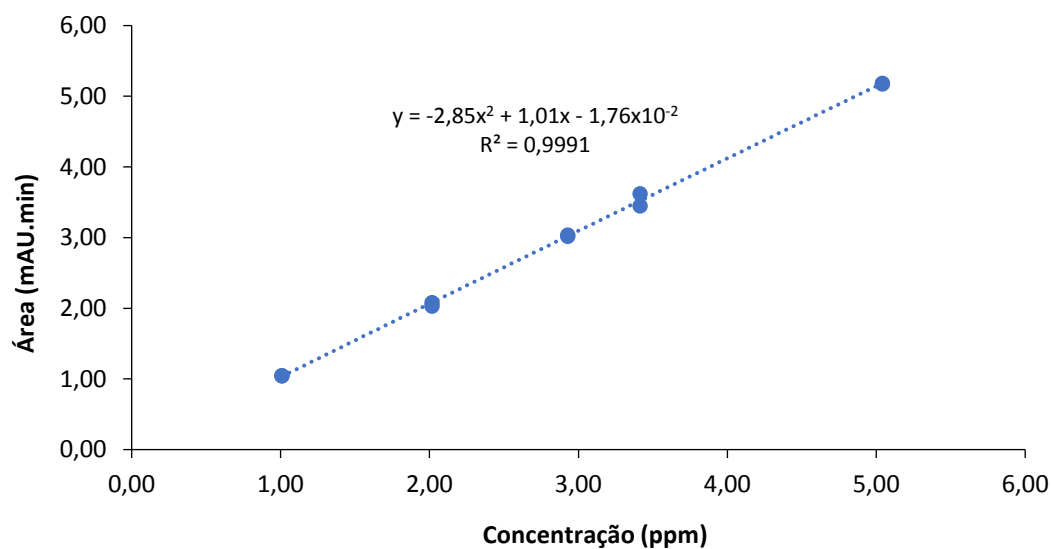


Figura 24: Regressão linear de segundo grau (1-5 ppm)

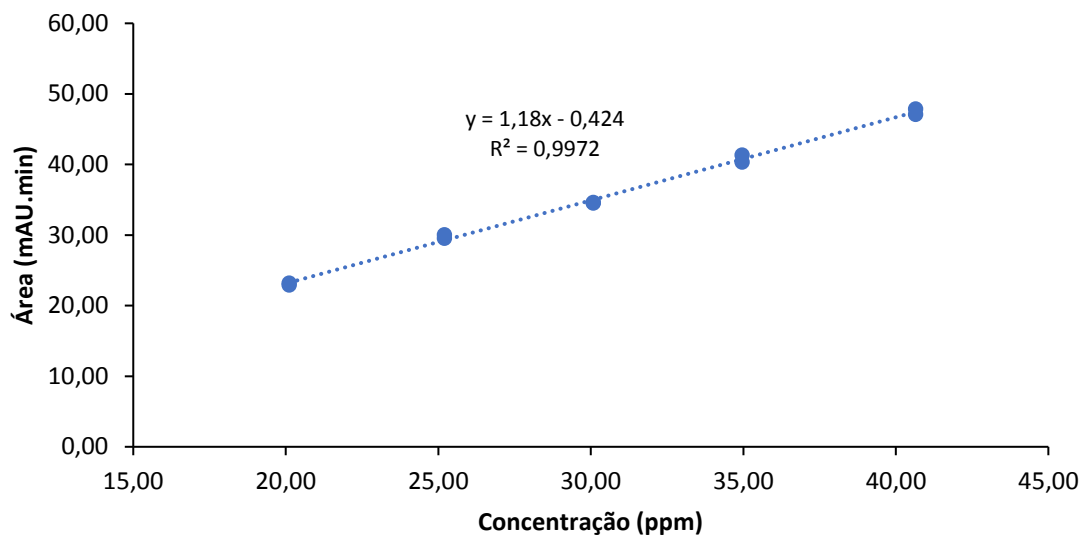


Figura 25: Regressão linear de primeiro grau (20-40 ppm)

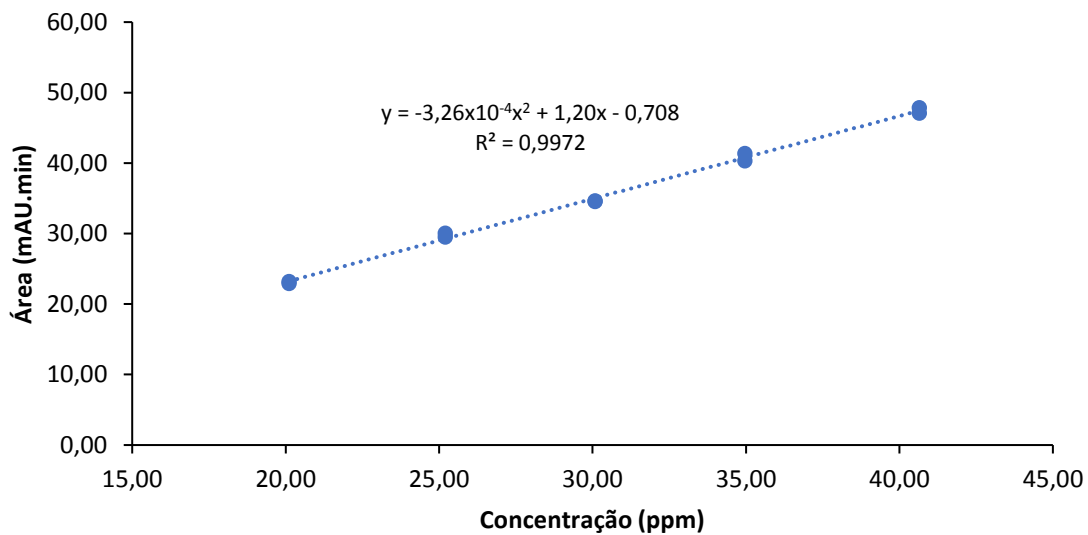


Figura 26: Regressão linear de segundo grau (20-40 ppm)

Tabela 18: Resultados do teste de linearidade do método 1

Gama de trabalho	1 – 5 ppm	20 – 40 ppm
S_Y \bar{x}	$4,82 \times 10^{-2}$	0,503
S_{Y^2}	$5,12 \times 10^{-2}$	0,538
N	10	
DS²	$2,72 \times 10^{-4}$	$2,13 \times 10^{-3}$
PG	$1,04 \times 10^{-1}$	$7,37 \times 10^{-3}$
F_{tab.(0,05;1;7)}	5,59	
Conformidade	Sim	

Os valores DS^2 e PG foram calculados a partir das equações 21 e 22 tendo-se comparado o valor de teste (PG) com o valor de $F_{tab.(0,05;1;7)}$ para um grau de confiança de 95%. Dado que PG é menor do que o correspondente valor da distribuição de Fisher, pode-se concluir que a regressão linear é uma boa aproximação nas gamas de concentrações utilizadas. Não foram aceites retas de calibração cujo coeficiente de correlação (r^2) fosse inferior a 0,995.

7.1.2. Sensibilidade

A sensibilidade do método analítico foi avaliada para concentrações de analito equivalentes às concentrações dos extremos das respetivas retas de calibrações. A sensibilidade do detetor (declives das duas retas de calibração), bem como os valores da sensibilidade do método analítico expressos sob a forma do inverso do desvio padrão da concentração do analito e da diferença mínima de concentrações que o método permite discriminar, com um grau de confiança de 99%, encontram-se registados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19: Sensibilidade do detetor

Gama de trabalho	1 – 5 ppm	20 – 40 ppm
S_T (mAU.min.ppm ⁻¹)	1,03	1,18

Tabela 20: Valores de S_M e ΔC do método analítico

Concentração	1,01 ppm	5,04 ppm	19,8 ppm	40,6 ppm
ΔC (ppm)	0,23	0,38	3,9	6,1
S_M (L.mg ⁻¹)	18,2	11,3	1,1	0,7

As sensibilidades do detetor para as duas gamas de concentração ensaiadas são semelhantes, o que era de esperar que acontecesse, pois o desdobramento da gama de concentrações em duas gamas de trabalho não foi devido à quebra da linearidade, mas à falta de homogeneidade da variância. Todavia, o mesmo já não acontece com a sensibilidade do método analítico, que apresenta valores distintos para as duas gamas de concentração. Como há homogeneidade de variâncias dentro de cada gama de concentrações, considera-se que a sensibilidade do método analítico é constante dentro de cada gama de concentrações, pelo que se despreza as pequenas variações de sensibilidade que se observam dentro de cada gama de trabalho.

De realçar a baixa sensibilidade do método analítico quando aplicado à gama de maior concentração. Nesta gama, a diferença de concentrações que o método discrimina, com um grau de confiança de 99%, é de cerca de 6 ppm, o que é bastante elevado para as exigências internas do laboratório. Por esta razão, sugere-se que o método analítico deixe de ser aplicado à gama de maior concentração e, em alternativa,

recomenda-se a diluição das amostras a ensaiar de modo a serem ensaiadas na gama de menor concentração.

7.1.3. Seletividade da separação cromatográfica

A seletividade do método analítico quando aplicado às diferentes amostras ensaiadas foi avaliada pela sua capacidade em separar o analito dos restantes constituintes das amostras, aqui designados por interferentes. Como já foi referido, a seletividade do método analítico identifica-se com a seletividade da separação cromatográfica, que é medida pelo fator de seletividade quando acompanhado pela resolução entre o pico do analito e os picos dos dois interferentes mais próximos. Os resultados obtidos da avaliação da seletividade para o método 1 encontram-se sistematizados nas Tabelas 21, 22 e 23.

Tabela 21: Seletividade do método 1 para a amostra 1

	Interferente 1	Biocida A	Interferente 2
Tempo de retenção (min)	2,33	2,93	3,80
Tempo morto (min)		0,72	
Largura de pico (min)	0,09	0,12	0,17
Fator de retenção	1,83	2,56	3,61
Fator de seletividade	1,39		1,41
Resolução	5,67		5,99

Tabela 22: Seletividade do método 1 para as amostras 3 a 7

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 3	1	1,15	2,23
	2	2,02	12,6
Amostra 4	1	1,15	2,64
	2	2,01	14,2
Amostra 4 ^R	1	1,15	2,77
	2	1,75	10,6
Amostra 5	1	1,15	2,71
	2	1,17	2,57
Amostra 5 ^R	1	1,15	2,77
	2	1,15	2,24
Amostra 6	1	1,23	3,10
	2	1,15	2,32
Amostra 7	1	2,00	7,71
	2	1,39	4,45

(^R) Amostra dopada.

Tabela 23: Seletividade do método 1 para as amostras 8 a 16

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 8	1	1,14	1,52
	2	1,15	1,77
Amostra 9	1	2,00	7,17
	2	1,40	4,14
Amostra 10	1	1,14	1,52
	2	1,39	4,14
Amostra 10^R	1	1,14	1,63
	2	1,39	4,34
Amostra 11	1	1,99	7,65
	2	1,26	3,21
Amostra 13	1	1,36	3,38
	2	1,39	4,34
Amostra 14	1	1,15	1,87
	2	1,39	4,47
Amostra 16	1	1,23	3,37
	2	1,15	2,44

(^R) Amostra dopada.

Para as diferentes amostras ensaiadas encontrou-se invariavelmente um fator de seletividade superior a 1,14, enquanto a resolução mínima foi de 1,52. Nestas condições, pode-se afirmar que o método analítico é seletivo no que diz respeito à separação do biocida A dos restantes constituintes que fazem parte das 16 amostras ensaiadas. Garante-se também que a área de sobreposição entre os interferentes e o biocida A nunca ultrapassa 0,2% da área do analíto, permitindo a correta integração e consequente quantificação daquele biocida.

Ao contrário do que seria de esperar, atendendo à complexidade das amostras ensaiadas, a separação cromatográfica está a responder com a seletividade pretendida pelo Laboratório.

7.1.4. Limites analíticos

Os limites de deteção e quantificação do método analítico foram calculados a partir do procedimento descrito no capítulo 5. Os seus valores encontram-se indicados na Tabela 24.

Tabela 24: Resultados relativos aos limites analíticos do método 1

[Biocida A]_{Pad.Inf.} (ppm)	1,01
S/N_{Pad.Inf.}	203,7
S/N_{LOD}	3,3
S/N_{LOQ}	10
LOD_M (ppm)	0,02
LOQ_M (ppm)	0,05

De modo a confirmar os valores dos limites de deteção e quantificação do método analítico procedeu-se à análise de 10 repetições de soluções padrão vestigiais de biocida A 20 ppb e 53 ppb, respetivamente. A partir destes ensaios avaliou-se a razão sinal/ruído para as duas concentrações. Os resultados do sinal analítico estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Verificação do limite de deteção e quantificação do método analítico

	Sol. Pad. 20 ppb	Sol. Pad. 53 ppb
	0,240	0,543
	0,223	0,540
	0,227	0,497
	0,228	0,496
	0,232	0,491
	0,232	0,484
	0,232	0,484
	0,239	0,482
	0,254	0,479
	0,263	0,473
Média (mUA)	0,237	0,497
Desvio padrão da linha de base (mUA)	0,117	0,128
S/R	2,0	3,9

Verificou-se que as razões sinal-ruído (S/N) experimentais se encontram abaixo do esperado (3,3 e 10 respetivamente), pelo que as concentrações de 20 e 53 ppb não foram aceites como boas estimativas dos limites analíticos. Assim conclui-se que, a partir da forma de cálculo adotada, os valores previstos para este método encontram-se por defeito. Torna-se importante avaliar e se possível corrigir o modo de cálculo dos limites analíticos.

7.1.5.Exatidão

Para avaliar a exatidão do método analítico foram realizados testes de recuperação sobre várias amostras. Com esta finalidade, adicionou-se quantidades conhecidas de biocida A às amostras antes de serem submetidas ao habitual processo de extração. A partir da análise da amostra antes e após dopagem foi possível calcular a percentagem de recuperação por aplicação da equação 5. Também de forma a avaliar a exatidão foram analisadas amostras com teores conhecidos de biocida A.

Os resultados referentes à avaliação do método 1 encontram-se registados na Tabela 26. A percentagem de recuperação do biocida A nas diferentes amostras ensaiadas está compreendida entre 87 e 103%. Também o ensaio da amostra de referência revelou um afastamento por defeito de 11% entre a concentração obtida experimentalmente e a concentração esperada (3,6%). É importante mencionar que a adequação da amostra de referência à gama de trabalho do método 1 obrigou à diluição da amostra por um fator compreendido entre 1000 e 10000, o que decididamente contribuiu para o aumento da incerteza da determinação da concentração do biocida A na amostra de referência.

Tabela 26: Avaliação da exatidão do método 1 (Biocida A)

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 1	15	-	88
Amostra 2	ND	-	88
Amostra 3	2	-	103
Amostra 4	24	-	98
Amostra 5	22	-	99
Amostra 6	-	3,2*	-
Amostra 7	141	-	-
Amostra 8	2	-	-
Amostra 9	322	-	-
Amostra 10	6	-	87
Amostra 11	137	-	-
Amostra 12	ND	-	92
Amostra 13	171	-	102
Amostra 14	3	-	-
Amostra 15	ND	-	-
Amostra 16	17	-	-

ND: Não Detetado; (*) Concentração esperada: 3,6% (m/m).

A globalidade dos resultados mostra uma tendência para o método 1 quantificar o biocida A por defeito e com um desvio médio de 8%, o que resulta numa recuperação média de 92%, sem nunca se observar ensaios com recuperações abaixo de 80%. Nesta fase do desenvolvimento do método 1, estes resultados satisfazem perfeitamente os requisitos de satisfação exigidos pelo Laboratório.

7.1.6.Repetibilidade

A repetibilidade do método 1 foi avaliada a partir da realização de 10 repetições, em condições de repetibilidade, dos ensaios referentes às soluções correspondentes aos extremos de concentração das duas gamas de trabalho. Os resultados obtidos, bem como as respetivas médias, desvios padrão, variâncias e coeficientes de variação (CV_r) encontram-se indicados na Tabela 27.

Tabela 27: Resultados de ensaios de repetibilidade para o método 1 (Pad. 1, 5, 20 e 40 ppm)

	Solução padrão 1,01 ppm	Solução padrão 5,04 ppm	Solução padrão 19,8 ppm	Solução padrão 40,6 ppm
	1,01	5,03	19,0	38,9
	1,01	4,98	19,9	40,0
	1,10	5,12	20,8	41,6
	0,99	5,03	20,8	38,6
	1,10	5,19	20,8	38,7
	1,03	4,98	19,7	38,8
	0,99	5,06	19,4	41,8
	1,02	5,10	19,5	41,5
	1,15	5,15	20,5	41,7
	1,01	5,25	18,6	41,9
Média	1,04	5,09	19,8	40,4
Desvio padrão	$5,5 \times 10^{-2}$	$8,9 \times 10^{-2}$	$9,1 \times 10^{-1}$	1,5
Variância	$3,1 \times 10^{-3}$	$7,9 \times 10^{-3}$	$8,3 \times 10^{-1}$	2,2
Coeficiente de variação (CV_r) (%)	5,3	1,7	4,6	3,6
Repetibilidade (ppm)	$1,5 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-1}$	2,5	4,1

(*) Coeficiente de variação obtido a partir dos ensaios de repetibilidade

Como se referiu no capítulo 5, o critério de aceitação da repetibilidade imposto pelo Laboratório obriga a que a repetibilidade do método analítico seja inferior à repetibilidade prevista pela equação de *Horwitz* modificada para CV^* (equação 4).

Na Tabela 28 encontra-se registados os valores dos coeficientes de variação previstos pela equação de *Horwitz* modificada para as quatro concentrações ensaiadas do biocida A. Este valor foi usado como valor máximo permitido para aceitação dos valores de CV_r obtidos experimentalmente.

Tabela 28: Avaliação da aceitabilidade dos resultados de repetibilidade para o método 1

[Biocida 1] (ppm)	1,01	5,04	19,8	40,6
CV* (%)	10	8,4	6,8	6,1
CV _r (%)	5,3	1,7	4,6	3,6
Conformidade	Sim			

(*) Coeficiente de variação obtido pela equação de Horwitz

Como descrito por Horwitz, o coeficiente de variação tende a diminuir com o aumento da concentração do analito (Figura 27), enquanto a repetibilidade esperada seguirá uma tendência contrária.

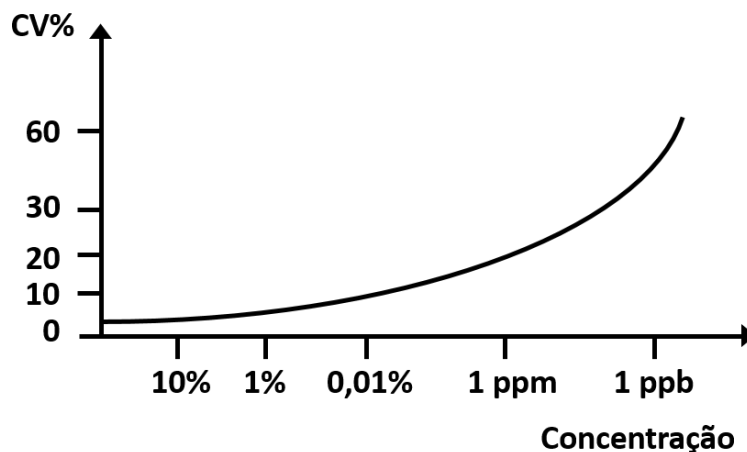


Figura 27: Representação gráfica da curva de Horwitz (metade da trompeta de Horwitz)

Tal como era exigido, observa-se que todos os valores de CV_r encontram-se abaixo dos respetivos valores estimados pela equação de Horwitz. De salientar que os valores de CV_r seguem a tendência prevista por Horwitz, com exceção do valor referente à concentração de 5,04 ppm, que é inesperadamente mais baixo do que os valores referentes às concentrações mais elevadas. Seria importante futuramente confirmar o valor de CV_r para a concentração de 5,04 ppm.

Perante os resultados obtidos verifica-se que todos os valores experimentais estão em conformidade com o critério de aceitação imposto. Os valores são então aceites para uma caracterização inicial do método analítico. No entanto é importante a avaliação contínua deste parâmetro de forma a impor critérios de aceitação mais restritivos.

7.1.7. Precisão intermédia

A precisão intermédia do método 1 foi avaliada através da execução de um plano experimental simplista caracterizado pelo ensaio, com repetição, das quatro soluções de biocida A correspondentes aos extremos de concentração das duas gamas de trabalho em 4 dias consecutivos. As médias, desvios padrão, variâncias e coeficiente de variação ($CV_{p.i.(tempo)}$) estão registados na Tabela 29.

Tabela 29: Resultados da determinação da precisão intermédia para o método 1

[Biocida 1] (ppm)	1,01	5,04	19,8	40,6
Dia 1	0,96	5,60	19,1	41,5
	1,03	4,93	21,1	38,7
Dia 2	1,12	4,93	20,7	38,9
	1,04	4,91	20,2	41,1
Dia 3	1,00	5,04	20,1	38,2
	1,04	4,80	18,6	39,9
Dia 4	1,04	4,74	20,5	41,7
	0,95	4,75	20,2	41,9
Média	1,02	4,96	20,0	41,5
Desvio padrão	$5,6 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-1}$	$8,2 \times 10^{-1}$	1,5
Variância	$3,1 \times 10^{-3}$	$7,7 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-1}$	2,2
Coeficiente de variação ($CV_{p.i.(tempo)}$) (%)	5,4	5,6	4,1	3,7
Conformidade	Sim			

Uma vez que a precisão intermédia foi avaliada apenas para o efeito temporal, constata-se que a influência do fator tempo na execução do método 1 não exerce qualquer influência significativa sobre o método porque os valores de $CV_{p.i.(tempo)}$ são semelhantes aos anteriormente obtidos na avaliação da repetibilidade, com exceção do valor referente à concentração de 5,04 ppm, que é superior. Todavia, como se suspeita que o valor de CV_r obtido em condições de repetibilidade para a concentração de 5,04 ppm não é credível, a diferença assinalada nos $CV_{p.i.(tempo)}$ não merece ser discutida.

Verifica-se que todos os valores de CV_r , obtidos em condições de precisão intermédia, estão em conformidade com o critério de aceitação imposto pelo Laboratório, que, recorde-se, impunha que os coeficientes de variação, dentro da gama de trabalho, não poderiam ser superiores a 10%.

7.2. Validação dos restantes métodos

Devido à falta de tempo não foi possível a completa validação dos restantes métodos. Relativamente ao biocida F, que é comercializado sob a forma de uma mistura de isómeros, não foi possível separar totalmente estes isómeros sem recorrer a separações cromatográficas exageradamente longas. Perante este facto, optou-se por se usar a área total dos diferentes isómeros no procedimento de quantificação do biocida F (Figura 28).

Como referido anteriormente, para os biocidas B e C foi desenvolvido apenas um método de separação cromatográfica, que permitiu a separação dos dois biocidas nas diferentes amostras ensaiadas (Figura 29)

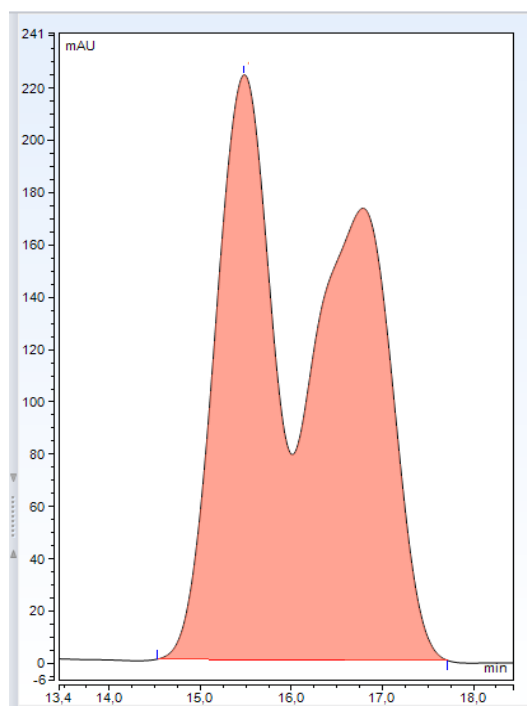


Figura 28: Cromatograma de uma amostra ensaiada contendo o biocida F

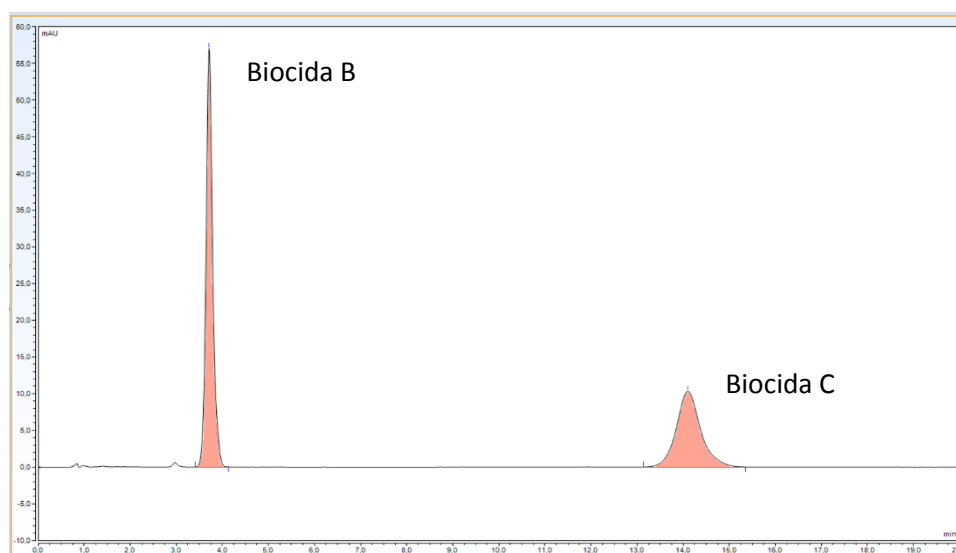


Figura 29: Cromatograma de uma amostra ensaiada contendo os biocidas B e C (Método 2)

Não foi possível avaliar a linearidade das retas de calibração ajustadas pelo critério dos mínimos quadrados através do método de *Mandel*. No entanto, as retas de calibração elaboradas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação (r^2), tendo sido rejeitadas todas aquelas com r^2 inferior a 0,995.

Como se pode verificar pela Tabela 30, todas as retas de calibração foram aceites por apresentarem um $r^2 > 0,995$.

Tabela 30: Retas de calibração

Biocida	Coeficiente de correlação	Declive (mAU.min.ppm ⁻¹)	Ordenada na origem (ppm)	Gama de trabalho (ppm)
B	0,9999	$2,98 \times 10^{-1}$	$1,09 \times 10^{-2}$	0,490 – 58,7
C	0,9999	$1,92 \times 10^{-1}$	$5,52 \times 10^{-3}$	0,515 – 61,8
D	0,9996	$8,92 \times 10^{-2}$	$2,20 \times 10^{-1}$	50,5 – 219
E	0,9998	2,35	-88,5	253 – 400
F	0,9976	2,23	-9,36	153 – 305
G	0,9998	$9,82 \times 10^{-1}$	-11,5	46,9 – 64,5

7.2.1. Sensibilidade

De salientar que a sensibilidade da técnica instrumental (S_T) depende da absorvidade dos biocidas ensaiados, isto é, da quantidade de radiação absorvida pelo biocida, ao comprimento de onda da medição, por unidade de concentração e de trajeto ótico. Por isso, espera-se que biocidas com estruturas moleculares idênticas conduzam a sensibilidades semelhantes. As sensibilidades (S_T) referentes os biocidas B – G distribuem-se fundamentalmente por 2 grupos distintos. O grupo constituído pelos biocidas B, C e D, caracterizado por apresentar uma sensibilidade dentro do intervalo $0,09 - 0,3$ mAU.min.ppm⁻¹. Enquanto os restantes biocidas (E, F e G) formam um segundo grupo com uma sensibilidade S_T compreendida entre 1 e 2 mAU.min.ppm⁻¹ (Tabela 31). Este comportamento é explicado pela diferença das absorvidades dos biocidas entre cada grupo, em consequência das diferenças assinaláveis nas estruturas moleculares dos biocidas. Por sua vez, dentro de cada grupo as estruturas moleculares dos biocidas são semelhantes, o que explica a semelhança entre as absorvidades dos biocidas. A sensibilidade da técnica instrumental, bem como os valores da sensibilidade dos métodos analíticos (S_M) expressos sob a forma do inverso do desvio padrão da concentração do analito e da diferença mínima de concentrações (Δ_C) que os métodos permitem discriminar, com um grau de confiança de 99%, encontram-se registados nas Tabelas 31 e 32.

Tabela 31: Sensibilidade da técnica analítica para os biocidass B – G (métodos 2 – 6)

Biocida	B	C	D	E	F	G
S_T (mAU.min.ppm ⁻¹)	$2,98 \times 10^{-1}$	$1,92 \times 10^{-1}$	$8,92 \times 10^{-2}$	2,35	2,23	$9,82 \times 10^{-1}$

Tabela 32: Sensibilidade do método de determinação dos biocidas B – G (métodos 2 – 6)

Biocida		B	C	D	E	F	G
Limite inferior	Δ_c (ppm)	0,013	0,063	1,3	6,6	0,71	0,11
	S_M (L.mg ⁻¹)	336,7	67,3	3,2	0,6	6,0	37,5
Limite Superior	Δ_c (ppm)	1,5	1,7	1,1	4,5	0,73	0,31
	S_M (L.mg ⁻¹)	2,8	2,5	3,9	0,9	5,8	13,8

De uma forma geral a sensibilidade do método analítico tem um comportamento decrescente com a concentração. Os métodos 3, 4 e 5 são aqueles que apresentam menor sensibilidade para concentrações perto do limite de concentração inferior da reta de calibração. É importante realçar que para o biocida E a diferença de concentrações que o método discrimina, com um grau de confiança de 99%, para concentrações perto do limite inferior da reta de calibração, é de cerca de 7 ppm, o que é bastante elevado para as exigências internas do laboratório. Propõem-se uma avaliação contínua do método, de modo a conferir se este mantém o mesmo comportamento ao longo do tempo. Se possível seria importante implementar alterações ao método de modo a diminuir o desvio padrão associado à concentração interpolada.

7.2.2. Seletividade

Pelas razões já apontadas anteriormente para o método 1, a seletividade dos métodos 2-6 também foi avaliada através do fator de seletividade e da resolução da separação cromatográfica dos biocidas presentes nas diferentes amostras ensaiadas. Não foram aceites os casos em que os critérios de aceitação não foram respeitados, ou seja $\alpha = 1$ (ou muito próximo de 1) ou $R < 1,5$. Os resultados obtidos da avaliação da seletividade para o método 1 encontram-se dispostos nas Tabelas 33 a 38.

Tabela 33: Resultados do cálculo de seletividade para o biocida B

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 7	1	1,32	3,91
	2	1,19	2,58
Amostra 7^R	1	1,32	3,30
	2	1,20	2,21
Amostra 8	1	1,32	3,77
	2	1,19	2,23
Amostra 8^R	1	1,32	3,40
	2	1,20	2,25
Amostra 9	1	1,32	3,59
	2	1,20	2,65
Amostra 9^R	1	1,32	3,07
	2	1,20	2,16
Amostra 13	1	1,42	3,16
	2	1,20	2,16
Amostra 13^R	1	1,31	2,96
	2	1,20	2,18
Amostra 11	1	1,34	2,57
	2	1,19	2,04
Amostra 15	1	1,28	3,13
	2	1,20	2,65
Amostra 17	1	1,32	3,47
	2	1,20	2,40
Amostra 20	1	1,32	3,52
	2	3,71	16,5

(^R) Amostra dopada.

Tabela 34: Resultados do cálculo de seletividade para o biocida C

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 10 ^R	1	1,28	6,13
Amostra 13 ^R	1	1,28	3,45
Amostra 18	1	1,18	3,29
Amostra 18 ^R	1	1,19	2,00
Amostra 19	1	1,19	3,71
Amostra 19 ^{Rp}	1	1,19	4,21
Amostra 19 ^{Ra}	1	1,19	3,44
Amostra 21	1	2,32	8,03
Amostra 22	1	2,23	7,34
Amostra 23	1	2,22	7,65

(^R) Amostra dopada; (^{Rp}) Amostra dopada com solução padrão; (^{Ra}) Amostra dopada com aditivo.

Tabela 35: Resultados do cálculo de seletividade para o biocida D

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 10	2	1,15	1,51
Amostra 17	2	1,52	4,74
Amostra 18	1	1,60	4,45
	2	1,34	3,08
Amostra 21	1	1,23	1,75
	2	1,83	6,61

Tabela 36: Resultados do cálculo de seletividade para o biocida E

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 24	1	1,21	3,64
Amostra 25	1	1,21	3,69
Amostra 26	1	1,21	3,46
Amostra 27	1	1,13	2,83
	2	1,09	1,90
Amostra 28^R	1	1,21	3,54
	2	1,32	5,30
Amostra 29	1	1,12	2,17
	2	1,33	5,51
(^R) Amostra dopada			

Tabela 37: Resultados do cálculo de seletividade para o biocida F

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 24	1	1,59	2,66
Amostra 25	1	1,59	2,56
Amostra 26	1	1,45	5,36
Amostra 27	1	1,45	5,30
Amostra 28^R	1	1,45	5,19
Amostra 30	1	1,45	4,95
(^R) Amostra dopada			

Tabela 38: Resultados do cálculo de seletividade para o biocida G

	Interferente	Fator de seletividade	Resolução
Amostra 31	1	1,74	10,9
	2	1,58	8,84
Amostra 33	1	1,48	7,98
	2	1,57	9,88

Dado que o valor da resolução (R) é sempre superior a 1,5 e o valor do fator de seletividade (α) superior a 1 para todas as amostras analisadas, os métodos 2, 3, 4 e 6 demonstraram ser seletivos para procederem à separação e quantificação dos biocidas. Estes valores levam a concluir que todos os picos cromatográficos estão

convenientemente separados ao nível da linha de base e as respetivas áreas são quantificadas sem interferência apreciável.

No caso do Método 5 (Biocida F), apesar do pico resultante da medição da área total ter uma resolução acima de 1,5, considera-se o método não seletivo pois não é possível separar os vários isómeros. Devido ao aglomerado de isómeros ocupar um grande período de tempo é importante analisar brancos das matrizes antes da quantificação de biocida F. Desta forma garante-se que não existem compostos a co-eluir com os isómeros. Para todos os métodos, eram também analisados os solventes de extração (branco de solução) para garantir que não estavam contaminados.

7.2.3.Limites analíticos

Os limites analíticos referentes aos métodos 3, 4, 5 e 6 não foram estimados pelo facto da concentração do limite inferior da gama de trabalho ser bastante elevada.

De acordo com a forma de calculo já mencionada, os limites do método analítico foram todos calculados a partir da razão sinal-ruído dos analitos (Equações 10 e 11) e estão dispostos na Tabela 39.

Tabela 39: Limites analíticos para o método 2

Biocida	[Analíto] _{pad.inf.} (ppm)	S/N _{pad.inf.}	S/N _{LOD}	S/N _{LOQ}	LOQ (ppm)	LOD (ppm)
B	0,490	88,5			0,06	0,02
C	0,515	28,1			0,19	0,06
D	50,5	17,2	3,3	10	-	-
E	253	732			-	-
F	153	327			-	-
G	46,9	15,3x10 ³			-	-

É importante futuramente proceder à medição de soluções de concentrações próximas dos limites analíticos, de forma a comprovar os valores obtidos.

7.2.4. Exatidão

Como forma de avaliar a exatidão dos métodos analíticos, realizaram-se testes de recuperação em amostras abrangendo todos os métodos desenvolvidos (2 a 6). Destas amostras fizeram parte produtos acabados e matérias primas como aditivos e corantes. Também de forma a avaliar a exatidão foram analisadas amostras com teores de biocidas conhecidos. Os resultados referentes à avaliação dos métodos 2-7 encontram-se registados nas Tabelas 40 a 45.

A percentagem de recuperação do biocida B nas diferentes amostras ensaiadas está compreendida entre 90 e 99%. Também o ensaio da amostra de referência revelou uma grande proximidade entre a concentração obtida experimentalmente e a concentração esperada (2-3%). Relativamente ao biocida C, as percentagens de recuperação obtidas estão entre 94 e 102% e os ensaios das amostras de referência (mostra 18 e 21) revelam boa proximidade aos valores esperados (420 ppm e 12,5-15,0% respetivamente).

Em relação ao biocida D as percentagens de recuperação encontram-se entre 100 e 101%, no entanto visto este ser o método com menos determinações realizadas, aconselha-se o estudo da exatidão do método para mais amostras. Para a amostra 18 a concentração obtida encontra-se por defeito de 17%, pelo que é aceite com reservas necessitando de reavaliação futura. Este comportamento não se observa na amostra 20, pelo que esta apresenta uma concentração compreendida na gama de concentrações esperada (8-9,5%).

Os biocidas E e F foram avaliados sobre as mesmas amostras e apresentam percentagens de recuperação de 102 e 107% respetivamente. Quando a amostra 27 é avaliada para ambos os biocidas os métodos demonstram valores muito próximos dos esperados (3900 e 7200 ppm). Também, quando avaliados os teores de biocida E e F em amostras de referência distintas, os métodos demonstram uma boa proximidade aos valores esperados, tendo um afastamento de 8,8% para a amostra 29 e 6,9% para a amostra 30.

Relativamente ao método 7, este foi desenvolvido e implementado para a determinação do teor de biocida G apenas numa amostra, por esta razão apenas se fez a avaliação do teor numa amostra, do branco da matriz e de uma amostra de referência. Neste caso a percentagem de recuperação foi realizada sob a amostra de referência. Embora para a amostra 31 o método demonstre um afastamento de 10% relativamente

à concentração esperada, quando submetida a ensaio de recuperação o método apresenta uma recuperação total do biocida G.

Tabela 40: Taxa de recuperação do biocida B quantificado pelo método 2

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 7	197	-	90
Amostra 8	9	-	99
Amostra 9	239	-	90
Amostra 10	ND	-	-
Amostra 11	199	-	-
Amostra 12	ND	-	-
Amostra 13	234	-	91
Amostra 15	255	-	-
Amostra 17	283*	-	-
Amostra 20	-	2 ^{*2}	-
Amostra 22	ND	-	-
Amostra 23	ND	-	-

ND: Não Detetado; (*) Concentração esperada: <1000 ppm; (^{*2}) Concentração esperada: 2-3% (m/m).

Tabela 41: Taxa de recuperação do biocida C quantificado pelo método 2

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 7	ND	-	-
Amostra 9	ND	-	-
Amostra 10	ND	-	100
Amostra 11	ND	-	-
Amostra 12	ND	-	-
Amostra 13	ND	-	-
Amostra 18	420*	-	98
Amostra 19	393	-	102 ^{*2}
Amostra 19	393	-	94 ^{*3}
Amostra 21	-	14,9 ^{*4}	-
Amostra 22	348	-	-
Amostra 23	310	-	-

ND: Não Detetado; (*) Concentração esperada: 420 ppm; (^{*2}) Dopagem com solução padrão; (^{*3}) Dopagem com aditivo contendo biocida C; (^{*4}) Concentração esperada: 12,5-15,0% (m/m).

Tabela 42: Taxa de recuperação do biocida D quantificado pelo método 3

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 10	662	-	100
Amostra 17	2293	-	-
Amostra 18	150*	-	-
Amostra 20	-	9 ^{*2}	101

(*) Concentração esperada: 180 ppm; (^{*2}) Concentração esperada: 8-9,5 %(m/m).

Tabela 43: Taxa de recuperação do biocida E quantificado pelo método 4

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 24	3858	-	-
Amostra 25	3894	-	-
Amostra 26	3835	-	-
Amostra 27	3965*	-	-
Amostra 28	ND	-	102
Amostra 29	-	45,6 ^{*2}	-

ND: Não Detetado; (*) Concentração esperada: 3900 ppm; (^{*2}) Concentração esperada: 50,0 %(m/m).

Tabela 44: Taxa de recuperação do biocida F quantificado pelo método 5

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 24	7165	-	-
Amostra 25	7147	-	-
Amostra 26	7051	-	-
Amostra 27	7197*	-	-
Amostra 28	ND	-	107
Amostra 30	-	43,3 ^{*2}	-

ND: Não Detetado; (*) Concentração esperada: 7200 ppm; (^{*2}) Concentração esperada: 46,5 %(m/m).

Tabela 45: Taxa de recuperação do biocida G quantificado pelo método 6

	[Amostra] (ppm)	[Amostra] %(m/m)	% Recuperação
Amostra 31	-	27*	100
Amostra 32	ND	-	-
Amostra 33	7120	-	-

ND: Não Detetado; (*) Concentração esperada: 30 %(m/m).

Atendendo às taxas de recuperação encontradas para os diferentes ensaios, é possível concluir que o processo de extração dos biocidas está a ocorrer numa extensão compreendida entre 90 e 107%, ou seja totalmente dentro do intervalo 90-110% que define os requisitos de aceitação impostos pelo Laboratório.

Na globalidade os resultados mostram uma tendência para o método 2 quantificar o biocida B por defeito e com um desvio médio de 8%, o que resulta numa recuperação média de 92%, sem nunca se observar ensaios com recuperações abaixo de 90%. Para o método 3 os resultados mostram um desvio por defeito de 2% e média de 98%, tendo-se observado o resultado mínimo de 94%. Relativamente ao método 4, os resultados mostram uma média de 101%, sem valores abaixo de 100%. Os métodos 5 e 6 mostram percentagens de recuperação por excesso de 2 e 7%, e quando comparados os teores obtidos nas amostras 29 e 30 com os valores esperados observa-se resultados por defeito não superior a 8,8%. Em relação ao método 7 constata-se uma percentagem de recuperação de 100%

Nesta fase do desenvolvimento dos métodos, estes resultados satisfazem perfeitamente os requisitos de satisfação exigidos pelo Laboratório.

Através da análise da amostra 27, 28 e 30 verifica-se que, quer quando comparado através ensaios com amostras de referencia ou ensaios de recuperação, a quantificação do biocida F nas amostras analisadas está a ser completa, o que mostra que a aproximação feita é válida na gama de trabalho utilizada. Pode-se então validar as conclusões retiradas na avaliação da seletividade.

Em suma, conclui-se que os métodos evidenciam desempenhos experimentais de elevado grau de exatidão nos ensaios de biocidas em matérias primas e produtos acabados da indústria de tintas.

7.2.5. Precisão intermédia

Para a avaliação da precisão intermédia, submeteram-se a ensaio analítico, ao longo de quatro dias, as soluções de biocidas referentes aos limites das respetivas gamas de concentrações. Em cada dia foram realizados dois ensaios para cada solução em condições de repetibilidade. As médias, desvios padrão, variâncias e coeficiente de variação ($CV_{p.i.(tempo)}$) estão registados nas Tabelas 46 a 48.

Tabela 46: Ensaio de precisão intermédia para o método 2

	Biocida B		Biocida C	
	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)
Dia 1	0,497	59,0	0,516	62,1
	0,493	58,5	0,537	61,6
Dia 2	0,445	57,2	0,555	60,2
	0,475	57,2	0,491	60,2
Dia 3	0,498	59,2	0,522	61,6
	0,498	53,4	0,476	55,3
Dia 4	0,521	60,4	0,498	62,2
	0,524	60,7	0,486	55,1
Média	0,494	58,2	0,510	59,8
Desvio padrão	$2,5 \times 10^{-2}$	2,3	$2,7 \times 10^{-2}$	2,9
Variância	$6,4 \times 10^{-4}$	5,5	$7,4 \times 10^{-4}$	8,6
Coeficiente de variação ($CV_{p.i.(tempo)}$) (%)	5,1	4,0	5,4	4,9
Conformidade	Sim			

Tabela 47: Ensaio de precisão intermédia para o método 3 e 4

	Biocida D		Biocida E	
	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)
Dia 1	55,2	225	263	400
	55,4	226	272	402
Dia 2	48,4	220	269	396
	48,8	220	268	408
Dia 3	50,1	225	273	411
	54,2	224	274	409
Dia 4	49,7	-----	272	-----
	50,1	-----	272	-----
Média	51,5	224	270	404
Desvio padrão	2,9	2,8	3,6	5,9
Variância	8,4	7,8	13	35
Coeficiente de variação (CV _{p.i.(tempo)}) (%)	5,7	1,3	1,3	1,5
Conformidade	Sim			

Tabela 48: Ensaio de precisão intermédia para o método 5 e 6

	Biocida F		Biocida G	
	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)
Dia 1	153	304	50,4	62,5
	153	303	46,0	63,6
Dia 2	159	319	44,9	60,5
	159	322	48,7	60,2
Dia 3	161	291	43,3	62,7
	160	294	43,3	62,9
Dia 4	161	301	-----	-----
	160	301	-----	-----
Média	158	304	46,1	62,1
Desvio padrão	3,3	11	2,9	1,4
Variância	11	119	8,5	2,0
Coeficiente de variação (CV _{p.i.(tempo)}) (%)	2,1	3,6	6,3	2,2
Conformidade	Sim			

O Coeficiente de variação (CV_{p.i.(tempo)}) do biocida G apresenta ser o valor máximo encontrado (6,3%), estando os valores de CV_{p.i.(tempo)} compreendidos entre 1,3 e 6,3%.

De forma geral constata-se que para concentrações elevadas o $CV_{p.i.(tempo)}$ apresenta valores reduzidos, o que era previsto pela relação de *Horwitz*. Porém para os biocidas E e F constata-se um comportamento de $CV_{p.i.(tempo)}$ contrário ao que seria de esperar, pelo que se recomenda a reavaliação destas incertezas em trabalho futuro.

Constata-se que todos os coeficientes de variação estão de acordo com o critério de aceitação da precisão intermédia ($CV_{p.i.(tempo)} < 10\%$) imposto pelo Laboratório.

8 Conclusão

Neste trabalho utilizou-se a técnica de HPLC hifenada com um detetor UV-Vis para proceder à separação e quantificação de biocidas em tintas e matérias primas. Os biocidas foram previamente extraídos das amostras por solventes orgânicos, utilizando uma série de processos adaptados às propriedades dos analitos. Todos os processos de extração foram validados através de testes de recuperação que foram aplicados às amostras antes da extração. Também os ensaios com amostras de referência, cujos teores em biocidas eram conhecidos, conduziram a resultados bastante promissores, revelando grande proximidade entre os valores obtidos e os esperados. Apesar do método 1 apresentar algumas amostras com percentagens de recuperação ligeiramente inferiores a 90%, na maior parte das amostras a taxa de recuperação está compreendida entre 90% e 110%, que é o intervalo de aceitação imposto pelo Laboratório.

Relativamente ao biocida F, que ocorre sob a forma de uma mistura de isómeros, não foi possível separar convenientemente os vários isómeros, o que levou ao uso da área total dos picos sobrepostos dos isómeros para fins de análise quantitativa. Apesar desta decisão poder levar a erros na quantificação do biocida, os resultados dos ensaios de recuperação contrariam essa possibilidade ao observar-se taxas de recuperação no intervalo compreendido entre 90% e 110%. Mediante estes resultados, considera-se que a aproximação feita é válida na gama de concentrações utilizada. No entanto, este método não é ainda seletivo, pois não se conseguiu concretizar a separação dos vários isómeros.

Os métodos 1,2,3,4 e 6 mostraram desempenhos de elevada seletividade para com os biocidas analisados apresentando resoluções de picos cromatográficos superiores aos limites impostos pelo Laboratório. Da mesma forma que foi escolhido o critério de aceitação para a seletividade dos métodos, também foi escolhido o critério de aceitação para os correspondentes resultados de precisão e que se baseou no valor devolvido pela relação de *horwitz* modificada em condições de repetibilidade. Mediante este critério, todos os ensaios realizados em condições de repetibilidade exibiram uma incerteza menor do que a prevista pela função de *horwitz* modificada. Para os resultados da precisão intermédia também se verifica a aceitabilidade dos valores perante o critério imposto pelo laboratório ($CV_{p.i.(tempo)} < 10\%$)

Os métodos 4, 5 e 6 são aqueles que apresentam uma maior sensibilidade da técnica experimental, provavelmente devido aos biocidas E, F e G apresentarem as maiores absorvidades. Para as concentrações perto do limite inferior da reta de

calibração o método 2 é aquele que apresenta uma sensibilidade do método analítico superior. Consegue distinguir concentrações com uma diferença de 0,013 ppm em concentrações próximas do padrão inferior e de 1,5 ppm em concentrações próximas do padrão superior. Para concentrações superiores o método 6 é o que apresenta maior sensibilidade, distinguindo concentrações com uma diferença de 0,11 ppm em concentrações próximas do padrão inferior e de 0,31 ppm em concentrações próximas do padrão superior.

Não foi possível determinar valores de limites analíticos para o método 1 que se mostrassem boas estimativas, torna-se por isso necessário futuramente continuar o estudo dos mesmos. Propõem-se o mesmo procedimento para os métodos 2 e 3. Caso o método de cálculo continue a devolver valores por defeito considera-se a opção de alterar o mesmo de modo a conseguir melhores aproximações.

Inicialmente o foco e interesse deste estágio incidia sobre quatro biocidas. No entanto, devido às necessidades internas, estendeu-se o trabalho a mais três, ascendendo a um total de sete biocidas. Foram desenvolvidos e implementados seis métodos distintos que permitiram a separação e quantificação de todos os biocidas. Todos os resultados relativos à validação dos métodos foram avaliados de acordo com os critérios de aceitação impostos pelo Laboratório e descritos no capítulo 5.

Embora todos os resultados tenham sido aceites perante os critérios de aceitação utilizados, seria importante a reavaliação da precisão dos métodos 1, 4 e 5 de modo a confirmar os valores obtidos. Estes encontram-se aceites temporariamente. Também seria preponderante averiguar a resposta analítica dos vários parâmetros de mérito ao longo do tempo de modo a conseguir um melhor conhecimento dos métodos e a possibilitar o uso de critérios de aceitação mais restritivos.

Em suma conclui-se que os objetivos deste estágio foram alcançados e superados. Assim pode-se afirmar que o estágio contribuiu positivamente para a empresa munindo-a de ferramentas que possibilitam respostas breves e seguras a problemas futuros.

9 Referências bibliográficas

1. *Regulamento (UE) N.º 528/2012 do parlamento europeu e do conselho de 22 de maio de 2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas*, in 528, P. Europeu, Editor. 2012.
2. *Decreto-Lei n.º 121/2002 do Ministério da saúde de 3 de Maio*, in 121, M.d. saúde, Editor. 2002.
3. Göpferich, A., *Mechanisms of polymer degradation and erosion*. Biomaterials, 1996. **17**(2): p. 103-114.
4. www.sailmagazine.com/diy/bottom-paint-101. (27/09/2017)
5. Liu, D., et al., *Transformation of the new antifouling compound Irgarol 1051 by Phanerochaete chrysosporium*. Water Research, 1997. **31**(9): p. 2363-2369.
6. Voulvoulis, N., M.D. Scrimshaw, and J.N. Lester, *Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints*. Chemosphere, 2002. **47**(7): p. 789-795.
7. Fazenda, J.M.R., *Tintas e vernizes: ciência e tecnologia*. 2005: Edgard Blücher.
8. *ISO 4618:2012 - Paints and varnishes. Terms and definitions*. 2010-14. p. 144.
9. Anghinetti, I.C.B., *Tintas, suas propriedades e aplicações imobiliárias*. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Construção Civil da Escola de Engenharia da UFMG. Belo Horizonte, 2012.
10. MANUAL, E., *Painting: New Construction and Maintenance*. US Army, 1995.
11. NOGUEIRA, J.L., *Noções Básicas de Tintas e Vernizes*. Porto: ARCP – Associação Rede de Competências em Polímeros, 2008.
12. Rossmoore, H.W., *Handbook of biocide and preservative use*. 2012: Springer Science & Business Media.
13. de Saravia, S.G., et al., *Environmentally friendly products from plants in the control of biodeteriogen agents*. Natural Products: An Indian Journal, 2013. **9**(5): p. 167-174.
14. Karsa, D.R. and D. Ashworth, *Industrial biocides: selection and application*. Vol. 270. 2002: Royal Society of Chemistry.
15. Rothenburger, S.J., V.L. Higbee, and P.J. Lutz, *Stabilization of isothiazolone*. 2000, Google Patents.
16. Voulvoulis, N., M. Scrimshaw, and J. Lester, *Alternative antifouling biocides*. Applied organometallic chemistry, 1999. **13**(3): p. 135-143.
17. Bryld, L.E., T. Agner, and T. Menné, *Allergic contact dermatitis from 3-iodo-2-propynyl-butylcarbamate (IPBC)—an update*. Contact Dermatitis, 2001. **44**(5): p. 276-278.
18. Wilkinson, J.D., et al., *Monitoring levels of preservative sensitivity in Europe*. Contact Dermatitis, 2002. **46**(4): p. 207-210.
19. Williams, T.M., *The mechanism of action of isothiazolone biocides*. PowerPlant Chemistry, 2007. **9**(1): p. 14.
20. Alexander, B.R., *An assessment of the comparative sensitization potential of some common isothiazolinones*. Contact Dermatitis, 2002. **46**(4): p. 191-196.
21. Sadasivan, L. and U. Gandhi, *two-for-one" biocide for latex coatings: provides effective in-can and dry film preservation*. Paint & Coatings Industry, 2003. **7**.
22. Imai, H., *Antifungal composition*. 2004, Google Patents.
23. Fukuto, T.R., *Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides*. Environmental health perspectives, 1990. **87**: p. 245.
24. Marçon, P., *Modo de ação de inseticidas e acaricidas*. Informativo Dupont, São Paulo, 2003. **21**(7).

25. Elliott, M., N. Janes, and C. Potter, *The future of pyrethroids in insect control*. Annual review of entomology, 1978. **23**(1): p. 443-469.
26. Narahashi, T., *Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides*. Pharmacology & Toxicology, 1996. **79**(1): p. 1-14.
27. Tomlin, C., *The pesticide manual, a world compendium*. 12th edn. London. British Crop Protection Council, 2000.
28. U.S. Environmental Protection Agency, O.o.P., Pesticides, and Toxic Substances. *Bifenthrin Pesticide Fact Sheet*. 1988.
29. Fecko, A., *Environmental fate of bifenthrin*. Department of Pesticide Regulation: Environmental Monitoring and Pest Management Branch, Sacramento. 1999.
30. Johnson, R.M., et al., *Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (Apis mellifera)*. PloS one, 2013. **8**(1): p. e54092.
31. Velisek, J., Z. Svobodova, and V. Piackova, *Effects of acute exposure to bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Veterinarni Medicina, 2009. **54**(3): p. 131-137.
32. Velisek, J., Z. Svobodova, and J. Machova, *Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (Cyprinus carpio L.)*. Fish Physiology and Biochemistry, 2009. **35**(4): p. 583-590.
33. SANTOS, M.A.T., M.A. AREAS, and F.G.R. REYES, *Piretróides—uma visão geral*. Alimentos e Nutrição, 2007. **18**: p. 339-349.
34. Adeniyi, O.J., *Detection and Alleviation of Pesticide Residue in Food and Water*. 2016, University of Ibadan.
35. Morgan, M.K., et al., *Pyrethroid insecticides and their environmental degradates in repeated duplicate-diet solid food samples of 50 adults*. J Expos Sci Environ Epidemiol, 2016.
36. Kuang, H., et al., *Determination of enantiomeric fractions of cypermethrin and cis-bifenthrin in Chinese teas by GC/ECD*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010. **90**(8): p. 1374-1379.
37. HAMID, A., et al., *Assessment of human health risk associated with the presence of pesticides in chicken eggs*. Food Science and Technology (Campinas), 2017(AHEAD): p. 0-0.
38. Lorenzoni, D.-C., et al., *Could formaldehyde induce mutagenic and cytotoxic effects in buccal epithelial cells during anatomy classes?* Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, 2017. **22**(1): p. e58.
39. Crump, D.R., et al., *Characterizing Sources of Indoor Air Pollution and Related Sink Effects*. 1996. 224.
40. Kelly, T.J., D.L. Smith, and J. Satola, *Emission Rates of Formaldehyde from Materials and Consumer Products Found in California Homes*. Environmental Science & Technology, 1999. **33**(1): p. 81-88.
41. Rumchev, K., et al., *Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children*. European Respiratory Journal, 2002. **20**(2): p. 403-408.
42. Amiri, A. and A. Turner-Henson, *The Roles of Formaldehyde Exposure and Oxidative Stress in Fetal Growth in the Second Trimester*. Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing, 2017. **46**(1): p. 51-62.
43. O'Brien, P.J., A.G. Siraki, and N. Shangari, *Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health*. Critical Reviews in Toxicology, 2005. **35**(7): p. 609-662.
44. Rovira, J., et al., *Human health risks of formaldehyde indoor levels: An issue of concern*. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2016. **51**(4): p. 357-363.

45. Greenfield, S.A. and J.A. Dupont, *Formaldehyde stabilized coating compositions*. 1978, Google Patents.
46. Galhardo, C.M., *Biocidas em preparações pigmentárias*. 2012: p. 33.
47. Oshlack, B., M. Chasin, and F. Pedi, *Controlled release formulations coated with aqueous dispersions of acrylic polymers*. 1997, Google Patents.
48. Flyvholm, M.-A. and P. Andersen, *Identification of formaldehyde releasers and occurrence of formaldehyde and formaldehyde releasers in registered chemical products*. American Journal of Industrial Medicine, 1993. **24**(5): p. 533-552.
49. www.elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok. (27/09/2017)
50. Chust, R.B., *Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)*. Boletim SPQ, 1990. **39**: p. 43-53.
51. Swartz, M., *HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010. **33**(9-12): p. 1130-1150.
52. Webb, P.A., D. Ball, and T. Thornton, *Real-time absorbance ratio and absorbance difference measurements using dual-wavelength HPLC detectors*. Journal of chromatographic science, 1983. **21**(10): p. 447-453.
53. Harris, D.C., *Quantitative chemical analysis*. 2010: Macmillan.
54. Zhang, B., X. Li, and B. Yan, *Advances in HPLC detection—towards universal detection*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2008. **390**(1): p. 299-301.
55. Salthammer, T., *Photophysical properties of 3, 5-diacetyl-1, 4-dihydrolutidine in solution: Application to the analysis of formaldehyde*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1993. **74**(2-3): p. 195-201.
56. I. DeGraff, L. Nolan, C. Woolley., A. Fiorante., *Analysis of formaldehyde-DNPH and other carbonyl-DNPH derivatives by capillary gas chromatography*. Supelco, Inc., USA, 1998.
57. Michels, J.J., *Improved measurement of formaldehyde in water-soluble polymers by high-performance liquid chromatography coupled with post-column reaction detection*. Journal of chromatography A, 2001. **914**(1): p. 123-129.
58. Wu, Y., *GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED (CODEX STAN 193-1995) Adopted in 1995. Revised in 1997, 2006, 2008, 2009. Amendment 2010, 2012, 2013, 2014*. 2014.
59. *European Pharmacopoeia*. 2004, European Department for the Quality of Medicines.
60. Harvey, D., *Modern analytical chemistry*. 2000: McGraw-Hill New York.